

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ BENCICI NERI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE  
DE EXTRATOS VEGETAIS, UTILIZANDO CLUE-Q-TOF E QUIMIOMETRIA**



CURITIBA

2018

ANDRÉ BENCICI NERI

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE  
DE EXTRATOS VEGETAIS, UTILIZANDO CLUE-Q-TOF E QUIMIOMETRIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

CURITIBA

2018

Neri, André Bencici

Desenvolvimento de um modelo para avaliação da estabilidade de extratos vegetais, utilizando CLUE-Q-TOF e quimiometria / André Bencici Neri – Curitiba, 2018.

91 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Mikania glomerata*. 2. Quimiometria. 3. Espectrometria de massas. 4. Cromatografia. 5. Medicamentos fitoterápicos. 6. Controle de qualidade. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRÉ BENCICI NERI** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS, UTILIZANDO CLUE-Q-TOF E QUIMIOMETRIA**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

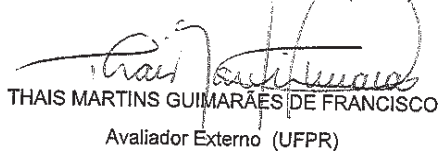
A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Abril de 2018.



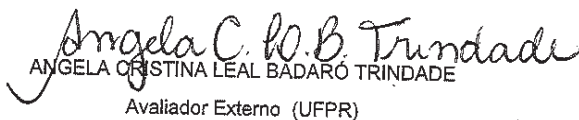
ROBERTO PONTAROLO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



THAIS MARTINS GUIMARÃES DE FRANCISCO

Avaliador Externo (UFPR)



ANGELA CRISTINA LEAL BADARÓ TRINDADE

Avaliador Externo (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e toda minha família, por sempre me apoiarem em minhas decisões.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo, pela confiança e por aceitar ser meu orientador. Obrigado por tudo.

Aos colegas do Centro de Estudos em Biofarmácia, que ajudaram durante todo o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, por minha formação profissional e pela oportunidade de participar do programa.

## RESUMO

A estabilidade química de fitoterápicos em geral é definida em função da quantificação de um marcador químico. Para o guaco tem-se considerado a cumarina como o marcador principal nos estudos de estabilidade. Porém, as drogas vegetais podem apresentar centenas de substâncias em diversas concentrações, e ainda essas substâncias podem ter algum efeito farmacológico, sinérgico ou não, quando administradas ao paciente. Por esse motivo, um modelo de estudo de estabilidade que considere não apenas o marcador, mas os metabolitos majoritários presentes na droga vegetal, é de grande importância para garantir qualidade, segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos. Para o estudo do fitocomplexo, além de ser necessário uma técnica analítica robusta e eficiente, são necessários métodos estatísticos que auxiliem na análise e interpretação dos dados, pois determinadas técnicas analíticas geram grandes quantidades de informação. A quimiometria é uma ferramenta estatística que tem sido utilizada para se analisar dados mais complexos e tem permitido separar amostras com características diferentes, podendo assim diferenciar amostras consideradas estáveis das não-estáveis (degradadas), sendo, portanto, uma ferramenta importante no controle de qualidade de drogas vegetais. O presente estudo teve como objetivo utilizar a análise de componentes principais (PCA) e o espectro de massas de extratos submetidos à diversas condições de estresses químico e físico e avaliar se é possível diferenciar amostras estáveis de não-estáveis e ainda buscar quais metabolitos sofreram alterações. Extratos hidroalcoólicos de folhas de *Mikania glomerata* foram preparados através de maceração com ajuda de sonicação (60 minutos) e submetido a diferentes condições de estresse: ácido (HCl 0,1 mol.L<sup>-1</sup>), básico (NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>), agente oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,0%), luz (UV – Visível) por 15 dias e estresse térmico (60°C) por 30 dias. As amostras obtidas em cada uma das diferentes condições foram diluídas e filtradas e posteriormente, analisadas por CLAE-DAD, com o objetivo de quantificar a cumarina e o ácido o-cumárico, e CLUE-Q-ToF, para a obtenção dos espectros de massas. Os dados espectrais obtidos por CLUE-Q-ToF foram analisados por PCA. A PCA conseguiu separar os grupos de amostras, por diferentes componentes principais. Os gráficos de *scores* e *loadings* foram avaliados na procura de *massas/cargas* (*m/z*) responsáveis pela distinção das amostras consideradas estáveis e degradadas. O método quimiométrico mostrou-se adequado na avaliação da estabilidade de fitoterápicos, pois conseguiu separar as amostras em função das alterações sofridas quando submetidas a diferentes condições de estresse e em diferentes tempos. Neste trabalho sugere-se que em um estudo de estabilidade de fitoterápicos deve-se avaliar o fitocomplexo e não apenas um único composto considerado como marcador.

**Palavras-chave:** *Mikania glomerata*. Quimiometria. PCA. Cromatografia líquida de ultra eficiência. Espectrometria de massas. Cromatografia líquida de alta eficiência.

## ABSTRACT

The chemical stability of phytotherapies is generally defined as a function of the quantification of a chemical marker. For guaco, coumarin has been considered its main marker in stability studies. However, plant drugs may contain hundreds of substances in varying concentrations, and even these substances may have some pharmacological effect, synergistic or not, when given to the patient. For this reason, a model of stability study that considers not only the marker, but the major metabolites present in the plant drug is of great importance to guarantee quality, safety and efficacy of herbal medicines. For the study of the phytocomplex, besides being necessary a robust and efficient analytical technique, statistical methods are necessary that aid in the analysis and interpretation of the data, since certain analytical techniques generate large amounts of information. Chemometrics is a statistical tool that has been used to analyze more complex data and has allowed to separate samples with different characteristics, thus being able to differentiate samples considered stable from non-stable (degraded), and, therefore, an important tool in the control of quality of plant drugs. The objective of the present study was to use the principal component analysis (PCA) and the mass spectra of extracts subjected to various chemical and physical stress conditions and to evaluate if it is possible to differentiate stable samples from non-stable ones and also to look for which metabolites have undergone alterations. Hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* leaves were prepared using maceration technique under sonication (60 minutes) and subjected to different stress conditions: acid ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ HCl}$ ), basic ( $0.1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ NaOH}$ ), oxidizing agent ( $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0%), light (UV - Visible) for 15 days and thermal stress ( $60^\circ\text{C}$ ) for 30 days. The samples obtained in each of the different conditions were diluted and filtered and later analyzed by HPLC-DAD, aiming the quantification of coumarin and o-coumaric acid, and UPLC-Q-ToF to acquire the mass spectra. The spectral data obtained by UPLC-Q-ToF were analyzed by PCA. The PCA was able to separate the groups of samples, by different principal components. The *scores* and *loadings* charts were evaluated, searching for *m/z* responsible for the distinction between samples considered stable and degraded. The chemometric method proved to be adequate in the evaluation of the stability of phytotherapies, because it was able to separate the samples in function of the alterations undergone when under different stress conditions and at different times. This study suggests that in a study of phytotherapeutic stability, the phytocomplex should be evaluated and not only a single compound considered as a marker.

**Keywords:** *Mikania glomerata*. Chemometrics. PCA. Ultra-performance liquid chromatography. Mass spectrometry. High performance liquid chromatography.

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - RELAÇÃO DE METABÓLITOS DO GUACO.....	22
QUADRO 2 - TEOR E ORIGEM DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NO ESTUDO .....	36
QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO .....	87



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DO ANALISADOR DE MASSAS TIPO Q-TOF .....	32
FIGURA 2 - CURVA ANALÍTICA OBTIDA POR CLAE-DAD PARA O PADRÃO DE CUMARINA .....	45
FIGURA 3 - CURVA ANALÍTICA OBTIDA POR CLAE-DAD PARA O PADRÃO DE ÁCIDO O-CUMÁRICO .....	45
FIGURA 4 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHFG .....	46
FIGURA 5 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHA (15º DIA) .....	47
FIGURA 6 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHB (15º DIA) .....	48
FIGURA 7 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHO (15º DIA).....	49
FIGURA 8 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHL (15º DIA).....	50
FIGURA 9 - ROTA METABÓLICA DA TRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO EM CUMARINA.....	50
FIGURA 10 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHC (30º DIA).....	51
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DO EHFG - MODO POSITIVO.....	53
FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS DO EHFG NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO.....	54
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHA (15º DIA) - MODO POSITIVO .....	55
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHB (15º DIA) - MODO POSITIVO .....	55
FIGURA 15 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHO (15º DIA) - MODO POSITIVO .....	56
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHL (15º DIA) - MODO POSITIVO .....	56
FIGURA 17 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHC (30º DIA) - MODO POSITIVO .....	57
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHFG - MODO NEGATIVO...	58
FIGURA 19 - ESPECTRO DE MASSAS DO EHFG NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	59
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHA (15º DIA) - MODO NEGATIVO.....	60

FIGURA 21 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHB (15° DIA) - MODO NEGATIVO.....	60
FIGURA 22 - CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHO (15° DIA) - MODO NEGATIVO.....	61
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHL (15° DIA) - MODO NEGATIVO.....	61
FIGURA 24 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHC (30° DIA) - MODO NEGATIVO.....	62
FIGURA 25 - GRÁFICO DE EINGENVALUES X NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS PARA TODAS AMOSTRAS EM IONIZAÇÃO POSITIVA .....	66
FIGURA 26 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC2 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO POSITIVA.....	67
FIGURA 27 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC3 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO POSITIVA.....	68
FIGURA 28 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (IONIZAÇÃO POSITIVA).....	69
FIGURA 29 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA COMPONENTE PRINCIPAL 2 (IONIZAÇÃO POSITIVA).....	70
FIGURA 30 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA COMPONENTE PRINCIPAL 3 (IONIZAÇÃO POSITIVA).....	71
FIGURA 31 - GRÁFICO DE EIGENVALUES X NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS PARA TODAS AMOSTRAS EM IONIZAÇÃO NEGATIVA.....	72
FIGURA 32 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC2 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	73
FIGURA 33 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC3 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO NEGATIVA .....	74
FIGURA 34 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (IONIZAÇÃO NEGATIVA).....	75
FIGURA 35 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA COMPONENTE PRINCIPAL 2 (IONIZAÇÃO NEGATIVA).....	76
FIGURA 36 - GRÁFICO DE <i>LOADINGS</i> DA COMPONENTE PRINCIPAL 3 (IONIZAÇÃO NEGATIVA).....	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TEOR DE CUMARINA EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ EM AMOSTRAS DE EXTRATO ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES DE EXTRESSE EM DIFERENTES TEMPOS .....	51
TABELA 2 - TEOR DE ÁCIDO O-CUMÁRICO EM $\mu\text{g.mL}^{-1}$ EM AMOSTRAS DE EXTRATO ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES DE EXTRESSE EM DIFERENTES TEMPOS .....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anvisa	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	–	<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> (Ionização Química a Pressão Atmosférica)
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
CL	–	Cromatografia líquida
CG	–	Cromatografia gasosa
CG-EM	–	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-EM/EM	–	CG acoplado a espectrometria de massas e recursos <i>Tandem</i>
CLAE	–	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	–	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos
CLAE-EM/EM	–	CLAE acoplado a espectrometria de massas e recursos Tandem
CLUE	–	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CP	–	Componente Principal
DAD	–	Detector de arranjo de diodos
EM	–	Espectrômetro de massas
ESI	–	<i>Electrospray ionization</i>
FE	–	Fase estacionária
FM	–	Fase móvel
ICR	–	<i>Ion cyclotron resonance</i>
IN	–	Instrução Normativa
<i>m/z</i>	–	massa/carga

mPa	–	milipascal
MS <sup>E</sup>	–	Espectrometria de massas com aquisição de dados utilizando baixa e alta energia de colisão simultaneamente
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
PCA	–	<i>Principal Component Analysis</i>
PVDF	–	Fluoreto de polivinilideno
p/v	–	peso/volume
Q	–	Quadrupolo
QqQ	–	Triplo quadrupolo
Q-TOF	–	<i>Quadrupole – tempo de voo</i>
RDC	–	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	–	Resolução específica
Renisus	–	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SUS	–	Sistema Único de Saúde
TOF	–	<i>Tempo de voo</i>
UPLC-HRMS	–	<i>Ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry</i>
UV	–	Ultravioleta
v/v	–	volume/volume
µm	–	micrometro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
3.1	FITOTERAPIA .....	19
3.2	GUACO – <i>Mikania</i> .....	20
3.2.1	Metabólitos do guaco.....	21
3.3	LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA FITOTERÁPICOS.....	23
3.4	PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO .....	24
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE FITOTERÁPICOS .....	25
3.5.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	27
3.5.2	Cromatografia líquida de ultra eficiência.....	28
3.5.3	Espectrometria de Massas .....	29
3.6	ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS.....	32
3.6.1	Pré-processamento .....	33
3.6.2	Análise de Componentes Principais (PCA).....	34
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL .....	36
4.2	PADRÕES ANALÍTICOS .....	36
4.3	REAGENTES E SOLVENTES .....	37
4.4	PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE GUACO (EHFG).....	37
4.5	PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DOS PADRÕES ANALÍTICOS .....	37

4.6	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA .....	38
4.7	ANÁLISES DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD .....	39
4.7.1	Preparo das soluções de trabalho .....	40
4.7.2	Preparo das amostras de extrato hidroalcoólico de folhas de guaco e extratos das condições de estresse .....	40
4.8	ANÁLISE POR CLUE-Q-TOF .....	40
4.8.1	Método de análise por CLUE-Q-TOF.....	41
4.8.2	Preparo dos padrões .....	42
4.8.3	Preparo das amostras.....	42
4.9	ANÁLISE DOS DADOS .....	43
<b>5</b>	<b>RESULTADOS e discussão.....</b>	<b>44</b>
5.1	EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE GUACO (EHFG).....	44
5.2	ANÁLISES POR CLAE-DAD DO EHFG .....	44
5.2.1	Análises dos extratos submetidos aos testes de estresse.....	46
5.3	ANÁLISES ATRAVÉS DE CLUE-Q-TOF .....	52
5.3.1	Amostras analisadas pelo modo positivo de ionização.....	52
5.3.2	Amostras analisadas pelo modo negativo de ionização. ....	57
5.4	PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS PARA AS ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS.....	62
5.5	ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA).....	64
5.5.1	Análise de componentes principais das amostras do modo positivo de ionização .....	65
5.5.2	Análise de componentes principais das amostras do modo negativo de ionização .....	71
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>78</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido a busca por terapias mais naturais, pois acredita-se que seja um tratamento com menos efeitos colaterais. Estima-se que, aproximadamente US\$ 22 bilhões são movimentados anualmente no mercado mundial de fitoterápicos, e destes, US\$ 400 milhões circulam no Brasil (CZELUSNIAK et al., 2012; FERREIRA et al., 2014). O Brasil é um país com alta biodiversidade e conta com um grande arsenal de produtos naturais, e possuindo grande potencial para se desenvolver neste setor (CAVALLAZZI, 2006).

A legislação brasileira entende por fitoterápico o medicamento cujo ativo é exclusivamente planta ou derivado vegetal, com finalidade curativa, paliativa ou profilática. *Mikania glomerata* consta da lista de fitoterápicos utilizados pela população e é encontrada em diversas partes do Brasil, principalmente na região sul e sudeste, do estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul. *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata* são as principais espécies do gênero *Mikania* com alguma atividade farmacológica comprovada. Popularmente elas são conhecidas como guaco e têm sido utilizadas na prevenção e tratamento de doenças do trato respiratório, devido suas atividades broncodilatadora, anti-inflamatória, antialérgica e antiespasmódica. Ambas as espécies foram incluídas na Farmacopeia Brasileira devido a suas atividades farmacológicas comprovadas com evidências pré-clínicas (COSTA et al., 2008; GASPARETTO, 2010).

A RDC nº 26/2014 é a norma vigente para registro de fitoterápicos no Brasil e tem como principais prerrogativas a avaliação e comprovação da estabilidade através de um marcador químico em insumos farmacêuticos ativos, produtos acabados e matéria prima vegetal. O guia para estudo de estabilidade avalia critérios como teor do marcador e, a partir deste resultado, é estabelecido o prazo de validade destes produtos (BRASIL, 2005a; 2014c).

Atualmente, práticas para garantir a qualidade de produtos são requisitos fundamentais para a comercialização, tanto nacional como internacional, principalmente em se tratando de produtos alimentícios ou farmacêuticos. A maioria das drogas vegetais não tem sua composição química bem elucidada, devido à sua complexidade em metabolitos. Um único vegetal pode conter centenas de substâncias em variadas concentrações, dificultando assim sua caracterização completa. A



composição química da matéria vegetal pode ainda ser alterada por diversos fatores, como as condições de cultivo, a procedência, o estágio de desenvolvimento, temperatura, nutrientes do solo, métodos de coleta, secagem e armazenamento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; ZHU et al., 2013).

Considerando o espectro de metabólitos relatados na literatura para esta planta e o fato de que na avaliação de sua estabilidade tem se considerado apenas o marcador cumarina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade de diferenciar amostras de extrato de guaco que sofreram alterações químicas com possíveis impactos na sua atividade biológica e por conseguinte na sua estabilidade, utilizando técnicas cromatográficas e espectroscópicas como CLAE-DAD e CLUE-Q-TOF, associada a análise de componentes principais (PCA) com a perspectiva de desenvolver um novo método para avaliação da estabilidade de extratos vegetais, tendo como modelo o extrato de guaco.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo para a avaliação da estabilidade de extratos vegetais, utilizando o extrato hidroalcoólico de guaco (*Mikania glomerata*), e como técnicas, CLAE-DAD e CLUE-Q-TOF aliado a quimiometria.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os extratos de folhas de guaco (*Mikania glomerata*) e realizar a caracterização físico-química destes;
- Submeter os extratos as diferentes condições de degradação forçada;
- Quantificar os extratos por CLAE-DAD;
- Obter o espectro de massas dos extratos por CLUE-Q-TOF;
- Comparar os espectros de massas dos extratos, antes e após o tratamento nas diferentes condições de degradação;
- Avaliar a estabilidade dos extratos pelo método da análise de componentes principais (PCA);
- Apontar possíveis metabólitos responsáveis pelas alterações cromatográficas e possíveis produtos de degradação.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FITOTERAPIA

Os produtos naturais vêm sendo utilizados para o tratamento de diversas enfermidades há séculos e por muito tempo representou a única opção terapêutica disponível para o homem. Grande parte do conhecimento acumulado sobre o uso de plantas medicinais está disponível nos dias atuais. A partir do século XX, com o avanço das indústrias farmacêuticas e o desenvolvimento de compostos sintéticos, os produtos naturais perderam espaço para a alopatia. A preferência por tratamentos com produtos farmacoquímicos dá-se pela facilidade na obtenção de compostos puros, passíveis de modificações estruturais e ainda, que têm sua atividade potencializada, por conta de sua maior pureza (BUENO, 2007; RASKIN et al., 2002; RATES, 2001).

A partir de 1970, com o aumento da divulgação comercial de novos fitoterápicos, a medicina natural volta a ser uma escolha no tratamento e prevenção de doenças. Um outro motivo pelo qual o interesse por fitoterápicos aumentou foi que a medicina convencional mostrou algumas limitações, como efeitos colaterais indesejáveis e sua possível ineficácia terapêutica, além da dificuldade no desenvolvimento de novos compostos mais eficazes (FERREIRA et al., 2014; GASPARETTO, 2010).

Diante da comprovação de ações terapêuticas de plantas medicinais e do fato de que a população vem questionando os perigos do uso irracional e abusivo de produtos sintéticos, a busca por terapias naturais vem aumentando nos últimos anos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária em 80% da população de países em desenvolvimento e, destes, 85% utilizam plantas medicinais ou derivados. Aproximadamente, US\$ 22 bilhões por ano são movimentados no mercado de fitoterápicos no mundo.(BRASIL, 2001; CZELUSNIAK et al., 2012).

O desenvolvimento de pesquisas para a descoberta de novas terapias a partir de plantas medicinais vem crescendo no Brasil e se destacando, internacionalmente. O país possui uma das maiores biodiversidades do mundo, conhecimentos a respeito

das terapias tradicionais e uma rica diversidade cultural e étnica (FERREIRA et al., 2014; GASPARETTO, 2010).

### 3.2 GUACO – *Mikania*

A família Asteraceae compreende, aproximadamente, 1100 gêneros e 25000 espécies. Exemplares desta família são encontrados em todos os tipos de habitat, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul. Devido à variedade na classe de metabólitos desta família, a composição química torna-se mais importante na caracterização das espécies do que a morfologia (CZELUSNIAK et al., 2012).

Pertencente a tribo Eupatorieae, o gênero *Mikania* conta com aproximadamente 430 espécies, que estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil são encontradas 171 espécies, difundidas pelos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Dentre as principais espécies medicinais deste gênero, encontram-se *M. laevigata* e *M. glomerata*, ocorrendo principalmente desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul (CZELUSNIAK et al., 2012; GASPARETTO, 2010).

Por compartilharem o mesmo habitat, as espécies *M. glomerata* e *M. laevigata* têm seus constituintes químicos e estrutura morfoanatômica semelhantes, sendo assim, difícil a sua distinção. O período de floração é uma das principais diferenças entre elas, sendo que *M. laevigata* floresce em setembro e *M. glomerata* em janeiro. Para diferenciá-las, deve-se buscar ainda evidências científicas que abordem aspectos farmacológicos, químicos, toxicológicos, morfoanatômicos, genéticos e agrônômicos (GASPARETTO et al., 2012).

Popularmente conhecidas como guaco, as espécies de *Mikania* são amplamente utilizadas no tratamento e prevenção de doenças do trato respiratório, por possuírem atividades broncodilatadora, antialérgica e anti-inflamatória. Na medicina popular, o guaco é utilizado como antipirético, antiespasmódico, antiofídico, expectorante, antimalárico, dentre outros. Estudos recentes demonstraram que o guaco, ainda traz consigo atividades antiulcerogênicas, antimicrobiana, antifúngica, antiespasmódica, antidiarreica, antiedematogênica, antimutagênica e efeitos hipoglicemiantes devido a presença de diversos constituintes químicos (ALVES et al.,

2009; COLLAÇO et al., 2012; COSTA et al., 2008; FERREIRA; OLIVEIRA, 2010; GASPARETTO et al., 2012).

A Farmacopeia Brasileira traz em seu registro as duas espécies, por possuírem benefícios terapêuticos comprovados. Inicialmente, apenas *Mikania glomerata* foi oficializada na Farmacopeia Brasileira, em 1929, enquanto a monografia de *Mikania laevigata* foi incluída na 4ª edição, em 2005 (BRASIL, 1929; 2005b).

A IN nº 02/2014, publicada pela Anvisa, traz a Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado, onde ambas as espécies de *Mikania* estão citadas, isentando-as de validação de segurança e eficácia, pois existe literatura suficiente para tal (BRASIL, 2014a; SILVA et al., 2012).

Devido à atividade terapêutica demonstrada, *Mikania glomerata* encontra-se no anexo II da portaria nº 2982 do Ministério da Saúde, que contém medicamentos e insumos complementares de referência para assistência farmacêutica na atenção básica em saúde. Ainda, o guaco está inserido na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que apresenta plantas medicinais que possuem potencial para gerar produtos ao SUS, através de estudos e pesquisas (BRASIL, 2009a; 2009b).

### 3.2.1 Metabólitos do guaco

A identificação e caracterização de compostos das espécies *M. laevigata* e *M. glomerata*, estão presentes na literatura e a maior parte dos trabalhos encontrados, é a respeito da cumarina, um dos principais constituintes do guaco. Estudos mostram também, caracterizações detalhadas, revelando a presença de terpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides, aldeídos, ésteres orgânicos, álcoois e ésteres, dentre muitos outros (GASPARETTO et al., 2012).

A cumarina (1,2-benzopirona) é considerada como metabólito majoritário no guaco e ocorre em maior concentração em folhas jovens e superiores de *Mikania laevigata* e *M. glomerata*. Os efeitos farmacológicos do guaco são atribuídos, principalmente, à presença de cumarina. Contudo, estudos demonstraram que outros metabólitos também podem produzir efeitos farmacológicos significantes, como o

ácido *o*-cumárico, siringaldeído, dihidrocumarina e ácido caurenóico. (GASPARETTO, 2010; GASPARETTO et al., 2012).

O gênero *Mikania* possui em sua estrutura química, majoritariamente diterpenos caurenóides (ácido caurenóico, ácido benzoilgrandiflorico e ácido cinamoilgrandiflórico) e derivados do ácido cinâmico (cumarina e ácido *o*-cumárico). A concentração de cada substância difere entre as espécies: *M. laevigata* apresenta maior teor de cumarina e ácido *o*-cumárico em relação a *M. glomerata*. Demais constituintes estão presentes em ambas, em quantidades semelhantes (BERTOLUCCI et al., 2009).

Para aprimorar o processo de extração e maximizar a obtenção de substâncias desejadas, se faz necessário o uso de diferentes solventes. O QUADRO 1 detalha os metabólitos extraídos em maior quantidade, conforme a fração de extração analisada.

QUADRO 1 - RELAÇÃO DE METABÓLITOS DO GUACO

FRAÇÃO	METABÓLITOS
Óleo Essencial	$\alpha$ -acorenol; $\alpha$ -cadinol; $\alpha$ -copaeno; $\alpha$ -humuleno; $\alpha$ -muurolol; $\alpha$ -pineno; $\alpha$ -terpinol; $\beta$ -pineno; $\beta$ -farneseno; $\beta$ -bourboneno; $\beta$ -cubebeno; $\beta$ -elemeno; $\beta$ -cariofileno; $\gamma$ -elemeno; (E)- $\beta$ -ocimeno; (E)-nerolidol; <i>p</i> -cimeno; $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ e $\Delta$ cardineno; $\alpha$ e TAU-caudinol; epi- $\alpha$ -bisabolol; epi- $\alpha$ -muurolol; aromadendreno; biciclogermacreno; óxido de cariofileno; acetato de citronelil; cumarina; cubebeno; elemol; germacreno-B; germacreno-D; globulol; limoneno; linalol; mirceno; nerolidol E; nonanal; sabineno; silvestreno; espatulenol; terpin-4-ol; trans-ocimeno; trans-cariofileno; 1,4-dimetoxibenzeno.
Extrato (Hexano e Diclorometano)	Campesterol; ácido caurenóico; ácido grandiflórico; estigmasterol; lupeol; acetato de lupeol; germacreno; sesquiterpenos; ácido 11-metilbutanóico; ácido <i>ent</i> -15 $\beta$ -benzoiloxicaur-16(17)-en-19-óico; $\beta$ -sitosterol; peróxidos.
Extrato Hidroalcoólico	Ácido <i>o</i> -cumárico; cumarina; estigmasterol; fitol; 1-etoxi-1-feniletanol; 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído; ácido hexanóico; hexadecanoato de etila; linoleoato de etila; caurenol; espatulenol; ácido hexadecanóico; ácido 9,12,15-octadecatrienóico; ácido cupressênico; ácido isopropiloxigrandiflórico; 2-5-ciclo-hexadieno-1,4-diona,2,6-bis; 1-octadeceno; ácido octadecanóico; éster diterpênico; óxido de cariofileno; ácido 10,13-octadecadienóico; lupeol; acetato de lupeol; ácidos benzoilgrandiflórico e cinamoilgrandiflórico.

FONTE: Adaptado de GASPARETTO et al. (2012).

Além dos compostos relatados no QUADRO 1, o guaco ainda apresenta ácido isobutiloxi-grandiflórico, siringaldeído, trans-meliotosídeo, cis-meliotosídeo, taraxerol,

adenosina, patuletina 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, kaempferol, 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo, metil-3,5-di-O-cafeoil quinato e 3,3',5-tri-hidroxi-4',6,7-trimetóxi-flavona e friedelina. Foram isolados das folhas de *M. laevigata* o taraxerol, trans-meliotosídeo, cis-meliotosídeo. Foram relatados ainda, compostos com atividade antitumoral, como a escopoletina, curcumeno e o psoralen (FERREIRA; OLIVEIRA, 2010; NAPIMOGA; YATSUDA, 2010; RUFATTO et al., 2013).

Recentemente, foram identificados 59 compostos voláteis e semi-voláteis de *Mikania glomerata*, utilizando micro extração em fase sólida e cromatografia gasosa como técnicas analíticas, sendo que alguns deles nunca haviam sido relatados em óleo essencial de *M. glomerata* como,  $\alpha$ -tujeno, tuja-2,4(10)-dieno,  $\beta$ -mirceno, p-cimeno, acetofenona, perileno,  $\alpha$ -canfolenal, trans-pinocarveol, trans-verbenol, pinocarvona, mirtenal, mirtenol, carvomentona, verbenona, trans-carveol,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno, 3,4-di-hidrocumarina,  $\beta$ -burboneno,  $\beta$ -cubeneno,  $\beta$ -elemeno, allo-aromadendreno  $\alpha$ -muuroleno, 1,5-epoxisalvial-4(14)-eno, salvial-4(14)-e-1-ona, epóxido de humuleno II, nor-copanona, 14-óxi- $\alpha$ -muuroleno, cariofile-4(14),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol, cariofile-3,8(13)-dien-5- $\beta$ -ol,  $\gamma$ -1-cadinal, 14-óxi- $\alpha$ -muuroleno, 10-oxo-isodauc-3-en-15-ol, beiereno, kaureno, atisereno, acetona hexa-hidrofarnesil, óxido de epi-13-manoil, beieren-18-al, beieren-18-ol, kauren-16-ol, beieren-9-ol (CAPPELARO; YARIWAKE, 2015).

É relevante identificar os fatores que podem influenciar a composição química do vegetal. Os metabólitos podem se alterar em termos de proporção, conforme variações sazonais, idade e desenvolvimento da planta, temperatura, altitude, radiação UV, índice pluviométrico, disponibilidade de nutrientes, dentre outros. Praticamente todos os metabólitos secundários são alterados conforme a época de coleta (CZELUSNIAK et al., 2012).

### 3.3 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA FITOTERÁPICOS

São considerados fitoterápicos, aqueles medicamentos cujos ativos são exclusivamente plantas ou derivados vegetais, sem a adição de outro composto ativo isolado, com finalidade curativa, paliativa ou profilática a fim de diagnóstico (BRASIL, 2001).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da Anvisa nº 26/2014 é a regulamentação em vigor para o registro de fitoterápicos no Brasil. Todos os requisitos necessários para a concessão são estabelecidos por ela, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrões de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas. A norma traz também a diferenciação entre marcador ativo e marcador analítico e ainda define perfil cromatográfico e estudo de estabilidade (BRASIL, 2014c).

A Instrução Normativa (IN) da Anvisa nº 04/2014, traz uma lista de plantas conhecidas e de uso estabelecido, que isenta o solicitante da comprovação de eficácia e segurança do medicamento, porém as especificações definidas na lista devem ser seguidas integralmente, como, por exemplo, a padronização/marcador e a parte da planta que será utilizada (BRASIL, 2014b).

Durante o processo de registro de um medicamento fitoterápico, deve ser apresentado o laudo de análise que, dentre outros ensaios, deve conter o perfil cromatográfico e o relatório de estudo de estabilidade. Como todos os fitoterápicos registrados devem cumprir requisitos mínimos de qualidade durante o período de comercialização, o estudo de estabilidade possui importância para o registro, aliado ao perfil cromatográfico (BRASIL, 2014c).

### 3.4 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

A monitorização de impurezas que podem estar contidas em medicamentos é de grande importância no controle de qualidade de fármacos, mesmo que não apresentem nenhuma possibilidade de afetar o conteúdo do produto. Produtos de degradação são definidos na legislação brasileira como o conjunto de substâncias observadas no insumo farmacêutico ativo (IFA) ou no medicamento acabado, quando este é exposto a determinadas condições (AHUJA, 2007; DOW et al., 2013; BRASIL, 2015).

De acordo com a avaliação dos requisitos regulamentares atuais, que são relevantes, os estudos de degradação forçada compreendem uma série de testes de estresse químicos e físicos. As condições de estresse típicas destes testes são: calor (Estresse térmico com calor seco e/ou calor úmido), fotoestabilidade, estresse por hidrólise (estresse químico – hidrólises ácida e básica) e oxidação (solução oxidante).



Antes da aplicação de qualquer teste, as condições deverão ser definidas de acordo com a composição da substância em estudo e a formulação final, com o processo de produção, condições de armazenamento e uso do produto (JANZEN, 2016).

Estudos de estabilidade são realizados para garantir a qualidade e eficácia de um produto farmacêutico, enquanto este estiver dentro do prazo de validade. O estudo é de grande importância, pois determina o tempo no qual a potência e a qualidade de produtos farmacêuticos encontram-se dentro dos limites especificados. A Resolução Específica (RE) da Anvisa nº 01/2005 estabelece as condições e critérios para realização de estudos de estabilidade de medicamentos fitoterápicos e produtos farmacêuticos (BOTT, 2008; BRASIL, 2005a).

Esta resolução define estudo de estabilidade como um conjunto de testes a ser realizado para obtenção de informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos, com o objetivo de definir o prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas. Para isto, devem ser realizados estudos de estabilidade acelerado e de longa duração e estudos de degradação forçada (BRASIL, 2005a).

Estudos de estresse objetivam induzir, de maneira rápida, degradações realistas de substâncias, para ativar todas as rotas de degradação que podem ocorrer durante o período de estocagem dos produtos farmacêuticos. As condições aplicadas nestes estudos contemplam a diversidade das condições ambientais as quais os produtos farmacêuticos são expostos e conseqüentemente, resultam no mais provável perfil de degradação (DOW et al., 2013).

As pesquisas relacionadas a estudos de estabilidade e degradação, no campo de produtos naturais, ainda são escassas e não abrangem a composição química dos vegetais como um todo, e sim, apenas o marcador considerado como o principal e com atividade.

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DE FITOTERÁPICOS

Práticas para garantir a qualidade de produtos são requisitos fundamentais para a comercialização, seja ela nacional, como internacional, principalmente quando se trata de produtos alimentícios ou farmacêuticos. Estas práticas, são aplicadas em geral, a processos e produtos que já são conhecidos e bem documentados, como

exemplo, as plantas medicinais que tem seu uso difundido no mundo inteiro. A maioria das drogas vegetais não tem a composição química bem elucidada devido à complexidade estrutural das plantas. Um único vegetal pode apresentar centenas de substâncias em variadas concentrações, dificultando assim a sua caracterização completa (ZHU et al., 2013).

A composição química do material vegetal ainda pode ser alterada por diversos fatores, como as condições de cultivo, a procedência, o estágio de desenvolvimento, temperatura, nutrientes do solo e ainda métodos de coleta, secagem e armazenamento (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Diversos métodos são descritos na literatura para quantificação e caracterização de metabólitos do guaco, pelas mais diversas técnicas analíticas. BERTOLUCCI et al. (2013a) demonstraram em seu trabalho, uma técnica de perfil químico por CLAE-DAD, para a quantificação da cumarina, do ácido o-cumárico, ácido benzoilgrandiflórico, ácido cinamoilgrandiflórico e ácido caurenóico. GASPARETTO et al. (2011) desenvolveram e validaram um novo método utilizando CLAE-EM/EM, que quantifica, simultaneamente, cinco importantes compostos do guaco (cumarina, ácido o-cumárico, siringaldeído, di-hidrocumarina e ácido caurenóico). Recentemente, MELO e SAWAYA (2015) validaram um método por CLUE-EM, para quantificação de cumarina e ácido clorogênico em amostras comerciais de guaco. Entretanto, não há um método de perfil cromatográfico completo, elucidando todos seus componentes. O Quadro 3 (Anexo 1), traz uma relação de diversas técnicas analíticas, presentes na literatura, para o estudo de *Mikania glomerata* e *laevigata*.

Por estes motivos, o perfil cromatográfico possui grande importância dentro do controle de qualidade de matérias primas vegetais, pois permite classificar, identificar, comparar e avaliar amostras, fornecendo melhor caracterização da matéria vegetal. O processo de obtenção do *fingerprint*, (traduzido do inglês como impressão digital) é complexo e requer informações que são adquiridas por cromatografia, associada a detectores que podem elucidar estruturas, como exemplo, a espectrometria de massas (EM) e detecção por arranjo de diodos (DAD) (CARVALHO, 2011).

A Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem um importante papel nas tecnologias de *fingerprint*. Entretanto a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) está tomando o lugar da CLAE, por contar com técnicas de análise mais

rápidas, economizando tempo e aumentando muito a eficiência da análise de *fingerprint* (ZHANG et al., 2016).

### 3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida (CL) surgiu em 1950, utilizando colunas com recheio irregular, com partículas de 100-200  $\mu\text{m}$ . Os avanços que foram alcançados nesta técnica foram impulsionados pelo desenvolvimento e aperfeiçoamento das fases estacionárias (FE), que foram modificadas, tornando-se mais seletivas, estáveis (química e fisicamente) e eficientes. A cromatografia líquida teve um desenvolvimento muito grande, nos últimos 40 anos, o que proporcionou à técnica, maior reprodutibilidade, eficiência, resolução e análises em menor tempo (MALDANER; JARDIM, 2009; NOGUEIRA; SOARES; ANDRADE, 2011).

A redução do tamanho das partículas na coluna resulta em empacotamento melhor, porém a pressão do sistema cromatográfico aumenta e torna-se necessário o desenvolvimento de equipamentos mais sofisticados, com o uso de bombas pressurizadoras para a eluição da fase móvel (FM). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se difere da cromatografia líquida por este motivo e é uma das técnicas mais utilizadas por laboratórios de controle de qualidade de indústrias farmacêuticas e químicas, por oferecer precisão e economia de tempo nas análises (GASPARETTO, 2010; NOGUEIRA; SOARES; ANDRADE, 2011).

Como o tamanho das partículas da fase estacionária influencia diretamente na resolução da análise (número de pratos teóricos), a técnica visa empregar recheios de colunas com partículas menores que 5  $\mu\text{m}$ , podendo alcançar uma eficiência em torno de 30.000 pratos/15 cm, utilizando colunas com partículas de 1,7  $\mu\text{m}$  de diâmetro (MALDANER; JARDIM, 2009; SKOOG et al., 2014).

O equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência deve ser mais elaborado, por conta da alta pressão, aumentando assim seu custo. É composto por um sistema de bombas, sistema de injeção de amostra, forno para a coluna cromatográfica, detector, interface de dados e computador. Cada análise é independente da outra e deve-se otimizar o equipamento para cada uma, portanto os parâmetros que serão utilizados são monitorados por computador e podem ser alterados conforme o método (GASPARETTO, 2010; SKOOG et al., 2014).

As interações entre soluto e fase estacionária (características físico-químicas de cada um) regem o princípio da separação. Portanto a seleção da fase estacionária deve ser feita cuidadosamente para a otimização da separação, assim como a temperatura do forno e a fase móvel. A cromatografia líquida possui modos de classificação, a cromatografia em fase normal, cromatografia em fase reversa, cromatografia por exclusão e cromatografia de troca iônica. Deve-se levar em consideração a natureza do composto, polaridade, peso molecular, seu caráter iônico para a escolha do tipo de cromatografia a ser realizada (GASPARETTO, 2010; SKOOG et al., 2014).

Em fase normal, a fase estacionária é polar e fase móvel é apolar (solventes orgânicos). O princípio desta técnica é baseado nas diferenças de forças da interação do soluto com a fase estacionária. É utilizada principalmente para análise de compostos sensíveis a água, separação de isômeros *cis-trans*, compostos quirais e isômeros geométricos (NAUSHAD; KHAN, 2014).

O modo mais utilizado em CLAE, contudo, é a cromatografia em fase reversa, que consiste no uso de uma fase estacionária de baixa polaridade e fase móvel de alta polaridade. É uma técnica robusta, aplicável a uma ampla faixa de moléculas, incluindo as polares e as carregadas, utiliza colunas eficientes e estáveis e permite um controle preciso de variáveis como pH, temperatura, concentração e tipo do solvente da fase móvel (GASPARETTO, 2010; NAUSHAD; KHAN, 2014).

### 3.5.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência

Baseada nos mesmos princípios da CLAE, a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) emprega partículas menores que 2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e alto fluxo da fase móvel, diminuindo ainda mais o tempo das análises, sendo essa técnica o avanço mais recente das técnicas de separação. Entretanto, a pressão neste sistema é muito maior que na CLAE, sendo necessário a utilização de instrumentos mais sofisticados, podendo operar acima de 100 mPa (15.000 psi). Além da adequação dos instrumentos para trabalhar com pressões altíssimas, houve outras modificações como: volumes internos menores, celas do detector sem dispersão e com alta taxa de detecção, colunas mais resistentes, injetores precisos para volumes pequenos e melhoramento no sistema de controle de dados (MALDANER; JARDIM, 2009).

A instrumentação da CLUE é mais sofisticada, desenvolvida para suportar altas pressões. O equipamento é composto de um sistema de injeção de amostra, forno da coluna, sistema de bombas e detector. Com essas características, temos ganhos de eficiência e resolução, sensibilidade e economia de tempo e solventes, em relação a CLAE (MALDANER; JARDIM, 2009; NOGUEIRA; SOARES; ANDRADE, 2011).

### 3.5.3 Espectrometria de Massas

Por possuir alta sensibilidade, rapidez e uma ampla diversidade em suas aplicações, a utilização da técnica de espectrometria de massas em métodos analíticos tem um evidenciado crescimento. Esta técnica, ainda possui a vantagem de conseguir uma identificação absoluta de compostos, na maioria dos casos, fornecendo peso molecular e identificação estrutural de moléculas. Assim a espectrometria de massas pode ser acoplada à cromatografia líquida, como detector. A espectrometria de massas se baseia no princípio da formação de íons moleculares dos compostos, como por exemplo, ionização eletrônica. Os íons moleculares e seus fragmentos podem sofrer fragmentações e podem ser identificados através de sua razão massa/carga ( $m/z$ ) (ARDREY, 2003; HOFFMANN; STROOBANT, 2007).

O equipamento de espectrometria de massas é composto por três componentes principais: A fonte de ionização, o analisador e o detector. É necessário revisar possíveis incompatibilidades entre o espectrômetro de massas e o equipamento de cromatografia líquida, antes de considerar a melhor escolha (ARDREY, 2003).

A formação de íons ocorre em duas etapas: volatilização dos analitos e posteriormente ionização. Atualmente, os métodos de escolha mais comuns são: ionização por *eletrospray* (ESI – *Electrospray Ionization*) e a Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) (GLISH; VACHET, 2003).

Na ionização por ESI, os íons são gerados à pressão atmosférica, em altas voltagens que fornece a energia necessária para a formação dos íons. Isso ocorre através de um capilar que passa por uma diferença de potencial em relação ao contra-

eletrodo (500 e 4500 V). A voltagem necessária vai depender dos solventes utilizados e do diâmetro do capilar (GLISH; VACHET, 2003).

ESI possui atributos notáveis, que permite seu uso em diversas análises, inclusive para moléculas de alto peso molecular. É uma técnica suave, pois é capaz de manter a molécula precursora intacta com uma ou múltiplas cargas carregadas positiva ou negativamente. O sistema é robusto, rápido, sensível e trabalha bem com solventes aquosos e orgânicos, sendo bastante adequado para o acoplamento com a cromatografia líquida. Adicionalmente, ESI permite trabalhar com analitos termicamente sensíveis, ampliando ainda mais a utilização deste sistema (ARDREY, 2003; GLISH; VACHET, 2003).

A maior parte dos espectrômetros de massa que possuem ESI vem equipada também com APCI. As duas técnicas apresentam similaridade no princípio da ionização e podem ainda ser complementares. APCI possui menor suscetibilidade de interferências em soluções concentradas e possui capacidade de ionizar rapidamente moléculas pouco polares. Porém, por trabalhar em altas temperaturas, pode causar decomposição em amostras termo lábeis e a formação de íons podem ser suprimidas por alguns solventes (GASPARETTO, 2010; GLISH; VACHET, 2003).

Além da fonte de ionização, há diversos tipos de analisadores de massa, que mensuram os íons de diferentes maneiras. Cinco tipos de analisadores são mais comumente usados atualmente. Eles são divididos em dois grupos: analisadores de transmissão e analisadores por captura. No primeiro, os íons deixam a fonte na forma de feixe, passando pelo campo eletromagnético até o detector. No segundo, os íons são presos no analisador por um campo eletromagnético, onde são avaliados ou injetados a outra fonte externa. Como exemplo de analisadores de transmissão, tem-se o Quadrupolo Simples (*Single Quadrupole*) e o Triplo Quadrupolo (Q). Já entre os analisadores de captura, figuram o Tempo de Vôo – TOF (*Time of Flight*), Captura de Íons (*Ion Trap*) e a Ressonância Ciclotrônica de Íons (ICR – *Ion Cyclotron Resonance*) (GLISH; VACHET, 2003).

Conceitualmente, o TOF pode ser considerado como o mais simples dos analisadores, pois separa os íons com base em na velocidade e no tempo de chegada até o detector. O princípio de funcionamento do TOF é a formação de todos os íons ao mesmo tempo na fonte, acelerados pelo tubo TOF. Com isso íons de menor  $m/z$  conseguem alcançar maiores velocidades do que íons de maior  $m/z$ . Após essa aceleração, eles percorrem uma determinada distância, antes de chegar ao detector.

A relação massa/carga ( $m/z$ ), pode ser medida com o tempo de chegada do íon até o detector após ser formado (ARDREY, 2003; GLISH; VACHET, 2003).

A resolução do TOF depende da capacidade de distinguir a diferença de tempo requerido, para íons de  $m/z$  próximos alcançarem o detector. Para aumentar a resolução pode-se aumentar a distância do tubo até o detector e com isso acentuar diferenças mínimas de tempo. Uma solução prática é o uso de espelhos, conhecidos como *reflectrons*, podendo alcançar resoluções maiores que 10000 pratos teóricos. Com isto, o analisador TOF possui vantagens como simplicidade e velocidade de varredura dos íons, sendo assim mais frequentemente utilizado em conjunto com a cromatografia líquida (ARDREY, 2003).

O analisador Quadrupolo é formado por quatro barras, dispostas simetricamente entre si. Os pares opostos são conectados eletricamente e uma voltagem, que consiste de uma radiofrequência e uma corrente direta, é aplicada. Essa corrente, faz com que os íons percorram uma trajetória pelo quadrupolo, alcançando assim, o detector. A trajetória é mantida pela oscilação do campo elétrico e, conforme o valor da voltagem, os íons de certa razão  $m/z$  chegam primeiro ao detector, podendo ser de forma crescente de  $m/z$  ou decrescente. O quadrupolo é ideal para cromatografia, por utilizar baixas voltagens e apresentar uma alta velocidade de varredura, podendo operar em altas pressões, como na cromatografia líquida de alta eficiência (ARDREY, 2003; GLISH; VACHET, 2003).

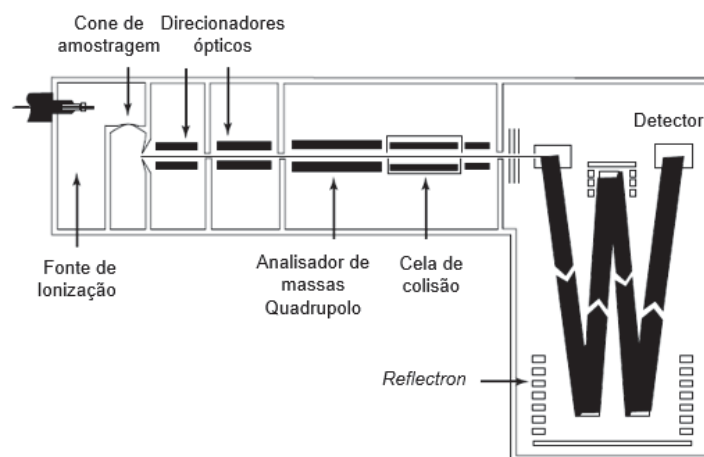
A espectrometria de massas vem sendo muito utilizada, por fornecer tanto o peso molecular quanto a informação da estrutura química de compostos. Esse aumento considerável de aplicações da espectrometria de massas se deve por um recurso de excelência, denominado *tandem* (EM/EM), ou espectrometria de massas em sequência. Como exemplo dessa instrumentação, há o triplo quadrupolo (QqQ), onde são ligados três quadrupolos em sequência. Destes três, o primeiro e o terceiro, trabalham como espectrômetros de massas e o segundo é utilizado como cela de colisão, onde serão formados os fragmentos de íons. Essa técnica possibilita o controle maior na escolha dos íons de determinada  $m/z$ , por possuir o primeiro e terceiro quadrupolo como filtros. Isso faz com que a especificidade da detecção aumente (ARDREY, 2003; GASPARETTO, 2010; GLISH; VACHET, 2003).

Outra técnica sequencial, bastante utilizada, é o quadrupolo-tempo-de-vôo. Pode ser descrito como um triplo quadrupolo, porém com o último quadrupolo, substituído por um analisador TOF. Os benefícios desta técnica são o aumento da



sensibilidade, resolução e precisão das massas, além da velocidade de obtenção do espectro das amostras, utilizando apenas um único pulso de íons. A FIGURA 1 traz um esquema geral do analisador de massas do tipo Q-TOF (CHERNUSHEVICH; LOBODA; THOMSON, 2001; GLISH; VACHET, 2003).

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DO ANALISADOR DE MASSAS TIPO Q-TOF



FONTE: Adaptado de ARDREY (2003).

### 3.6 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria é vasta em diversas áreas da química e seu surgimento data de 1971, na Suécia. O primeiro trabalho utilizando a quimiometria no Brasil foi realizado em 1981 e a partir deste, juntamente com o avanço tecnológico e a criação de softwares mais avançados, as produções científicas e pesquisas na área vem crescendo anualmente (CARVALHO, 2011; KUMAR et al., 2014).

A quimiometria é utilizada para a análise de dados multivariados através de métodos estatísticos ou matemáticos, com o objetivo de planejar ou selecionar experimentos e procedimentos otimizados de medidas destes dados. Estes dados podem ser fornecidos de cromatogramas, espectros, concentrações, entre outros. A quimiometria tem como objetivo facilitar a interpretação destes dados, considerados complexos, e extrair o máximo de informações possível. Diversas ferramentas



quimiométricas estão disponíveis, como utilização para calibração multivariada, pré-processamento de dados e reconhecimento de padrões (CARVALHO, 2011).

O reconhecimento de padrões possui duas abordagens distintas disponíveis, que são os métodos supervisionados e os métodos não supervisionados. Ambos os métodos têm como objetivo encontrar similaridades e diferenças entre amostras que geraram dados químicos complexos e podem ser aplicados ao mesmo conjunto de dados para fins diferentes (FRANCISCO, 2012; FERREIRA, 2015).

Os métodos não supervisionados apresentam um agrupamento dos dados obtidos, observando as tendências entre as amostras, podendo identificar similaridades e diferenças entre elas e ainda verificar as variáveis da análise. Alguns exemplos de análises que estão dentro deste grupo de métodos são: Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos por Métodos Hierárquicos (HCA) (CARVALHO, 2015).

Métodos supervisionados também buscam identificar similaridades e diferenças entre as amostras, mas requer formações de um conjunto de dados no qual o resultado deste já é conhecido e será utilizado para a construção do modelo preditivo. A partir deste, é realizada a classificação das amostras desconhecidas e a medição da precisão preditiva do modelo. Alguns exemplos de técnicas supervisionadas de reconhecimento de padrões são: Análise de Mínimos Quadrados Parciais (PLS) e Modelagem Independente de Analogias em Classe (SIMCA) (GOWDA et al., 2008).

### 3.6.1 Pré-processamento

Para a aplicação de um método quimiométrico em um conjunto de dados, na maioria das vezes, é necessária a realização de um pré-processamento destes dados. Existem vários tipos de pré-processamentos, entretanto os mais comumente utilizados são os dados centrados na média, autoescalamento, correção do espalhamento multiaplicativo (MSC), padronização normal de sinal (SNV) e alisamento (Savitzki-Golay) (FRANCISCO, 2012; FERREIRA, 2015).

O pré-processamento de dados centrados na média calcula o valor médio das colunas da matriz dos dados e este valor é subtraído das respectivas colunas, tornando cada coordenada dos dados mais centralizadas. Já o autoescalamento

subtrai o valor médio de cada elemento de uma coluna da matriz dos dados e divide o resultado pelo desvio padrão da coluna. O autoescalamento é recomendado quando a variável preditora tem natureza diferente e não é medida na mesma escala (FERREIRA, 2015).

A padronização de todas as variáveis na mesma variância tem como objetivo fazer com que todas as variações ao acaso influenciem por igual o modelo e remover qualquer tipo de tendência indesejada (FRANCISCO, 2012).

### 3.6.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais é um método de reconhecimento de padrões não supervisionados. A ideia central da PCA é reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados, que consiste em um grande número de variáveis inter-relacionadas, mantendo o máximo possível da variação presente no conjunto de dados, facilitando a interpretação dos mesmos (KUMAR, 2014)

O conjunto de dados na PCA é organizado como uma tabela de dados, ou matriz, onde as linhas constituem as amostras e as colunas representam as variáveis (como exemplo, relação massa/carga, comprimento de onda, entre outros). A aplicação da PCA na matriz de dados original ( $X$ ), faz com que esta seja decomposta em outras três matrizes: *scores* ( $T$ ), transposta de *loadings* ( $P^t$ ) e matriz de resíduos não explicados pelo modelo ( $E$ ). Novas variáveis são criadas, através da decomposição da matriz  $X$ , sendo estas ortogonais entre si chamadas de componentes principais (PCs) (ERIKSSON et al., 2006; FRANCISCO, 2012).

O novo conjunto de variáveis (PCs) traz como vantagem a concentração da maior parte da variância dos dados em poucas variáveis, fazendo com que a dimensionalidade dos dados diminua, sem perda de informação química. A maior porcentagem das variâncias é explicada pelas primeiras componentes principais, ou seja, a primeira componente principal (PC1) explicaria a maior parte da variância do conjunto de dados, a segunda componente principal explicaria a segunda maior parte da variância e assim sucessivamente com o restante das componentes principais (FRANCISCO; 2012).

A partir das novas matrizes geradas, é possível a criação de gráficos de *scores* e de *loadings* escolhendo um número  $x$  de PCs, obtendo-se gráficos

bidimensionais ou tridimensionais, respectivamente, permitindo uma avaliação dos conjuntos de dados e suas variáveis. O gráfico de *scores* traz como informação as coordenadas das amostras dadas pelas PCs, podendo reconhecer padrões através do agrupamento das amostras ou diferenciação entre si. Já no gráfico de *loadings*, observa-se os pesos de cada variável original na separação dos grupos representadas pelo gráfico de *scores* e para cada PC é atribuído um peso (MUNSON et al., 2005; FRANCISCO, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL

Para a realização das análises apresentadas neste trabalho, foi utilizado folhas secas de guaco (*Mikania glomerata*), obtidas de fornecedor local na cidade de Curitiba-PR. O laudo de identificação foi fornecido pelo fornecedor e trazia informações físico-químicas e a identificação botânica do vegetal.

### 4.2 PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões analíticos utilizados nas análises foram: Cumarina, ácido *o*-cumárico, siringaldeído e di-hidrocurarina. A origem e o teor destes são mostrados no QUADRO 2. Os padrões de siringaldeído e di-hidrocurarina foram utilizados apenas nas análises por CLUE-Q-TOF e, nas análises por CLAE-DAD foram utilizados apenas a cumarina e o ácido *o*-cumárico.

QUADRO 2 - TEOR E ORIGEM DOS PADRÕES ANALÍTICOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Substância	Teor (%)	Peso Molecular	Origem
Cumarina	99	146,14 Da	Sigma-Aldrich
Ácido <i>o</i> -cumárico	97	164,16 Da	Sigma-Aldrich
Siringaldeído	98	182,17 Da	Sigma-Aldrich
Di-hidrocurarina	99	148,16 Da	Sigma-Aldrich

FONTE: O Autor (2018).

A escolha destas substâncias foi devido às propriedades terapêuticas relacionadas a esses compostos, além destes serem descritos como majoritários nos extratos medicinais de guaco.

### 4.3 REAGENTES E SOLVENTES

Para o preparo do extrato, desenvolvimento do método e análises das amostras foram utilizados reagentes como etanol, metanol, acetonitrila e ácido fórmico, todos com pureza grau CLAE, adquiridos da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda). Foi utilizado também, formiato de amônio adquirido da Sigma-Aldrich. A água ultrapura foi obtida através do sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA).

### 4.4 PREPARO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE GUACO (EHFG)

O extrato foi preparado através da metodologia descrito por CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS (2001), considerando o rendimento de extração e quantidade de substâncias extraídas. As folhas foram trituradas em moinho de facas e o pó foi padronizado através de um tamis de malha 250  $\mu\text{m}$  (60 MESH). A proporção utilizada de folhas para líquido extrator foi de 1:10 (p/v), onde o solvente extrator utilizado foi etanol/água (70:30), visto que essa proporção tem melhor rendimento extrativo para a cumarina, além de ser a proporção utilizada pelas indústrias de fitoterápicos.

A técnica utilizada para a extração foi a maceração durante uma hora, com o auxílio de ultrassom para aumentar o rendimento e diminuir do tempo de extração. Foram preparados dois litros de extrato hidroalcoólico de guaco (EHFG), utilizando 200g de folhas secas de guaco e 2000 mL de líquido extrator (etanol:água 70:30 v/v), posteriormente filtrados em algodão.

### 4.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE DOS PADRÕES ANALÍTICOS

Todos os padrões utilizados durante o desenvolvimento do trabalho foram diluídos em metanol, na concentração de 1  $\text{mg.mL}^{-1}$  (solução estoque). Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração à 4°C. Para a análise em CLAE-DAD, os padrões foram diluídos em água/metanol/acetonitrila (65:30:5) v/v/v, mistura similar à fase

móvel utilizada para as análises. Para a análise em CLUE-Q-TOF, os padrões foram diluídos em acetonitrila/água (50:50) (v/v).

#### 4.6 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

O estudo foi realizado nas condições forçadas de degradação, com o objetivo de obter alguma degradação em um determinado período de tempo. Foram realizados testes nas condições ácida, básica, oxidativa, fotolítica e térmica. Os tempos e condições estão descritos no Quadro 4.

QUADRO 4 – CONDIÇÕES DE ESTRESSE UTILIZADAS DURANTE O ESTUDO

Condições de estresse	Reagentes	Tempo
Ácido (EHA)	0,1 mol.L <sup>-1</sup> HCl, T.A.	15 dias
Básico (EHB)	0,1 mol.L <sup>-1</sup> NaOH	15 dias
Agente Oxidante (EHO)	1% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , T.A.	15 dias
Luz (EHL)	UV + visível (26 W; 20 W), T.A.	15 dias
Calor (EHC)	60°C	30 dias

FONTE: O Autor (2018).

Nota: EHA – Extrato hidroalcoólico ácido; EHB – Extrato hidroalcoólico básico; EHO – Extrato hidroalcoólico oxidado; EHL – Extrato hidroalcoólico submetido a luz; EHC – Extrato hidroalcoólico submetido ao calor.

O extrato utilizado para cada uma das condições foi o extrato original, sem nenhuma diluição prévia. Na condição ácida, foi adicionado HCl 5 mol.L<sup>-1</sup> ao extrato numa proporção para que se alcançasse a concentração de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> de HCl. O mesmo foi realizado para a condição básica e oxidativa, para que alcançasse concentrações de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> NaOH e 1% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente. A solução inicial de NaOH foi de 5 mol.L<sup>-1</sup> e a de peróxido de hidrogênio foi de 30% (v/v).

As amostras das condições ácida, básica, oxidativa e térmica foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar, fechados com tampa e batoque. As amostras submetidas a condição fotolítica foram armazenadas em frascos transparentes, fechados com tampa e batoque. As soluções de ácido clorídrico 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, hidróxido de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e peróxido de hidrogênio 1% (v/v) foram todas preparadas no momento do uso. Os ensaios na condição fotolítica foram

realizados em uma câmara, combinando luz UV e luz visível (26W e 20W, respectivamente). As amostras submetidas apenas a calor, foram expostas a temperatura de 60°C, utilizando estufa com termostato.

As amostras das condições ácida, básica, oxidativa e fotolítica permaneceram nesta condição durante 15 dias e a coleta foi realizada a cada dois dias, totalizando sete coletas (T0 – T7). Já as amostras da condição térmica permaneceram por 30 dias armazenadas a 60°C e a coleta foi realizada a cada três dias, totalizando 10 coletas (T0 – T10). Cada coleta foi realizada em triplicata. O n total de amostras foi de 117.

#### 4.7 ANÁLISES DOS EXTRATOS POR CLAE-DAD

Todas as análises por CLAE-DAD foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent 1100 (Waldbronn, Germany), com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A, injetor automático G1320A e detector de fotodiodo (G1315B). O processamento dos dados foi realizado através do software ChemStation versão A 10.02.

O método de CLAE-DAD utilizado nas análises foi descrito por GASPARETTO (2010), sendo as condições cromatográficas utilizadas as seguintes:

- Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido Fórmico (65:30:5:0,1)
- Modo de eluição: Isocrático
- Pré-coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18 (12,5 x 4,6 mm e 5 µm de partícula (Agilent Technologies Inc.)
- Coluna: Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm e 5 µm de partícula (Agilent Technologies Inc.)
- Temperatura do forno: 25°C
- Fluxo: 1 mL min<sup>-1</sup>
- Volume de injeção: 20 µL
- Comprimento de onda: 274 nm
- Tempo de corrida: 20 min.

A fase móvel foi filtrada por membrana de PTFE 0,45 µm antes do uso.

#### 4.7.1 Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho utilizadas nas análises por CLAE-DAD, foram preparadas a partir das soluções estoques, onde a concentração final foi de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para cada um dos analitos. Foi realizado uma curva de calibração com oito níveis ( $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de concentração, seguindo o método realizado por GASPARETTO (2010). Todas as soluções foram diluídas em água/metanol/acetonitrila (65:30:5) v/v/v e filtradas através de filtro PVDF  $0,45 \mu\text{m}$  antes das injeções e analisadas em triplicata.

#### 4.7.2 Preparo das amostras de extrato hidroalcoólico de folhas de guaco e extratos das condições de estresse

Para o preparo das amostras de extrato, levou-se em consideração o teor de cumarina, o marcador principal do guaco, e também a concentração do ácido o-cumárico, visto que são as duas substâncias de maior teor na amostra da droga vegetal utilizada. Todas as amostras sofreram diluições de 1:1 v/v em diluente (água/metanol/acetonitrila, 65:30:5 v/v/v), em seguida filtradas através de filtro PVDF  $0,45 \mu\text{m}$  antes das injeções.

### 4.8 ANÁLISE POR CLUE-Q-TOF

Todas as análises realizadas por CLUE-Q-TOF foram realizadas no cromatógrafo líquido de ultra eficiência Acquity H-Class da Waters Corporation (Milford, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo tempo de voo (Xevo G2-S, Waters, Milford, EUA) com fonte de ionização por *electrospray*. O nitrogênio de alta pureza utilizado como gás de dessolvatação e gás do cone foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Chicago, EUA). O gás de colisão utilizado foi argônio com pureza  $>99,998\%$  da White Martins Praxair Inc. (Curitiba, Brasil). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas



foram processados através dos *softwares* MassLynx V 4.1 e MarkerLynx XS da Waters Corporation (Milford,EUA).

#### 4.8.1 Método de análise por CLUE-Q-TOF

Para o desenvolvimento do método por CLUE-Q-TOF, inicialmente foram testados parâmetros como fase móvel, tipo de eluição, volume de injeção, temperatura de forno, diferentes colunas e parâmetros do espectrômetro de massas. Foram realizadas análises tanto no modo positivo de ionização quanto no modo negativo, portanto os parâmetros do espectrômetro de massas foram ajustados de acordo com o tipo da ionização. Após o ajuste dos parâmetros o método ficou assim definido:

- Fase Móvel: (A) água e (B) metanol/água, ambos contendo ácido fórmico 0,05% (p/v) (modo positivo) ou formiato de amônio 5 mmol.L<sup>-1</sup> (modo negativo), eluída em modo gradiente a 400 µL.min<sup>-1</sup> conforme segue: Tempo 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%;
- Coluna: Acquity BEH Shield RP18 100 x 2,1 mm, partícula de 1,7 µm (Waters Corporation, Irlanda);
- Temperatura do forno da coluna: 35°C;
- Volume de injeção: 3 µL;
- Modo de aquisição dos dados: MS<sup>E</sup>;
- Energia de colisão: 6 V na aquisição em baixa energia e rampa de colisão de 20 a 40 V na aquisição de alta energia;
- Tempo de aquisição de dados: 9 min;
- Parâmetros da fonte de ionização para o modo positivo: voltagem do capilar: +3000 V, voltagem do cone: 40 V, *source offset*: 80 V, temperatura da fonte: 150°C, temperatura de dessolvatação: 20°C, gás do cone: 50 L.h<sup>-1</sup> e gás de dessolvatação: 600 L.h<sup>-1</sup>;
- Parâmetros da fonte de ionização para o modo negativo: voltagem do capilar: -2500 V, voltagem do cone: 40 V, *source offset*: 80 V, temperatura da fonte: 150°C, temperatura de dessolvatação: 20°C, gás do cone: 50 L.h<sup>-1</sup> e gás de dessolvatação: 600 L.h<sup>-1</sup>;

- Faixa de leitura de massas: 50 a 600 m/z.

Para garantir a precisão e exatidão dos resultados, as massas adquiridas pelas análises foram todas corrigidas pelo *lockspray*, automaticamente. A solução de *lockmass* utilizada foi de leucina-encefalina da Water Corporation (Milford, EUA) na concentração de 1000 ng.mL<sup>-1</sup>. O fluxo de infusão do *lockspray* utilizado foi de 20 µL.min<sup>-1</sup>. O calibrante utilizado foi o formiato de sódio 0,5 mmol.L<sup>-1</sup> produzido a partir de hidróxido de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Alemanha).

#### 4.8.2 Preparo dos padrões

As soluções de padrões utilizadas nas análises por CLUE-Q-TOF, foram preparadas a partir das soluções estoques, onde a concentração final foi de 200 ng.mL<sup>-1</sup> para cada analito. As soluções foram diluídas em metanol/água (50:50) v/v e filtradas em filtro 0,22 µm antes das injeções. Foi realizada apenas uma injeção do padrão, para a verificação do sinal no cromatograma e suas respectivas relações massa/carga.

#### 4.8.3 Preparo das amostras

Para o preparo das amostras de extrato considerou-se o teor de cumarina obtido por CLAE-DAD, sendo realizado uma diluição de 1:10 v/v em metanol/água (50:50) v/v. Essa concentração foi escolhida por apresentar o maior número de picos, uma contagem de íons e picos m/z aceitáveis. Todas as amostras foram filtradas através de filtro PVDF 0,22 µm antes das injeções.

#### 4.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados adquiridos nas análises por CLUE-Q-TOF foram processados antes de serem submetidos às análises estatísticas. Esse processamento dos dados foi realizado pelo software MarkerLynx XS da Water Corporation (Milford, EUA). Este processamento foi realizado em todas as amostras, todos os sinais massa/carga presentes nos espectros obtidos e organizou os sinais e suas respectivas intensidades em uma tabela. Ele correlaciona todas as amostras analisadas e adiciona zeros nas colunas que não existem em certas amostras, mas existem em outras, evitando assim algum conflito posterior, durante as análises quimiométricas.

Posteriormente a este processamento, os dados foram organizados em forma de matriz pelo Excel (Microsoft Office) e estes foram submetidos às análises de componentes principais (PCA) utilizando o *software* Matlab 7.0.1® (Mathworks) em operação com o PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvector Research). Os gráficos de *scores*, obtidos pela PCA serviram para fazer a separação de grupos de amostras e os gráficos de *loadings* tiveram como objetivo identificar os sinais das massas que mais contribuíram para a discriminação dos grupos de amostras estáveis e não estáveis.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHAS DE GUACO (EHFG)

O rendimento da extração foi 86,5%, obtendo-se um extrato de cor esverdeada escura, com precipitados, anteriormente a filtração. O pH do EHFG foi de 5,82, de densidade 1,029 g.mL<sup>-1</sup>. O teor de sólidos totais do EHFG foi de 3,235%, partindo de 20 g da solução extrativa.

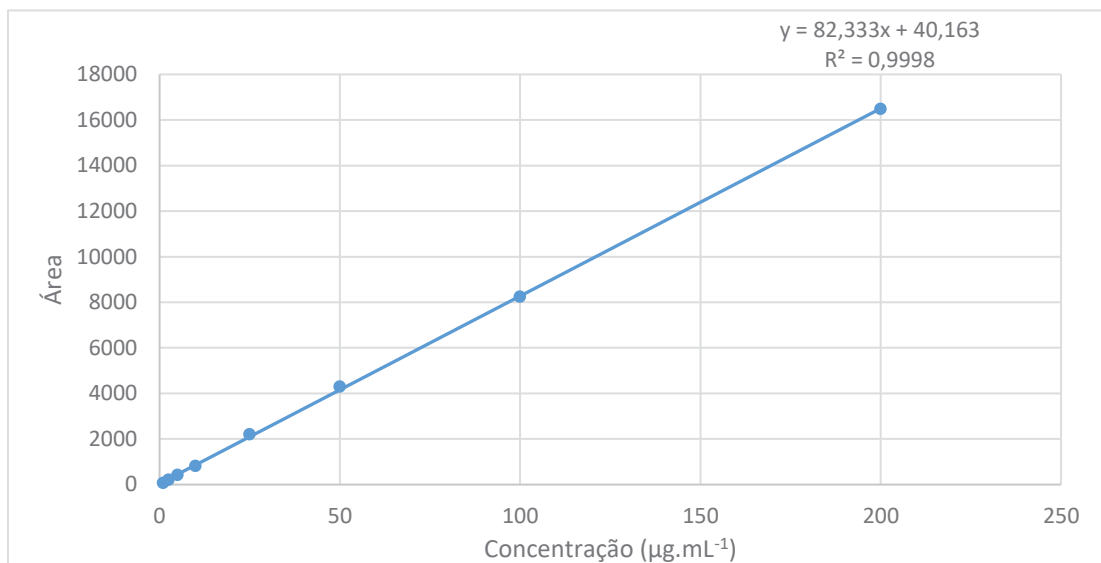
A maceração das folhas, juntamente com a sonicação, se mostrou um método bastante efetivo para extração da cumarina, considerando a razão tempo e rendimento, em comparação à extração realizada sem sonicação. A solução hidroalcoólica é uma das mais empregadas para as extrações de cumarina e outros metabólitos principais, devido à alta polaridade destes compostos (CELEGHINI; VILEGAS; LANÇAS, 2001; PASSARI; SCARMINIO; BRUNS, 2014).

### 5.2 ANÁLISES POR CLAE-DAD DO EHFG

O EHFG foi analisado por CLAE-DAD, com o objetivo de quantificar o marcador principal do guaco, a cumarina, e também o ácido o-cumárico, metabólitos majoritários. A análise pelo método CLAE-DAD serviu de comparação com o método CLUE-Q-TOF desenvolvido no presente trabalho.

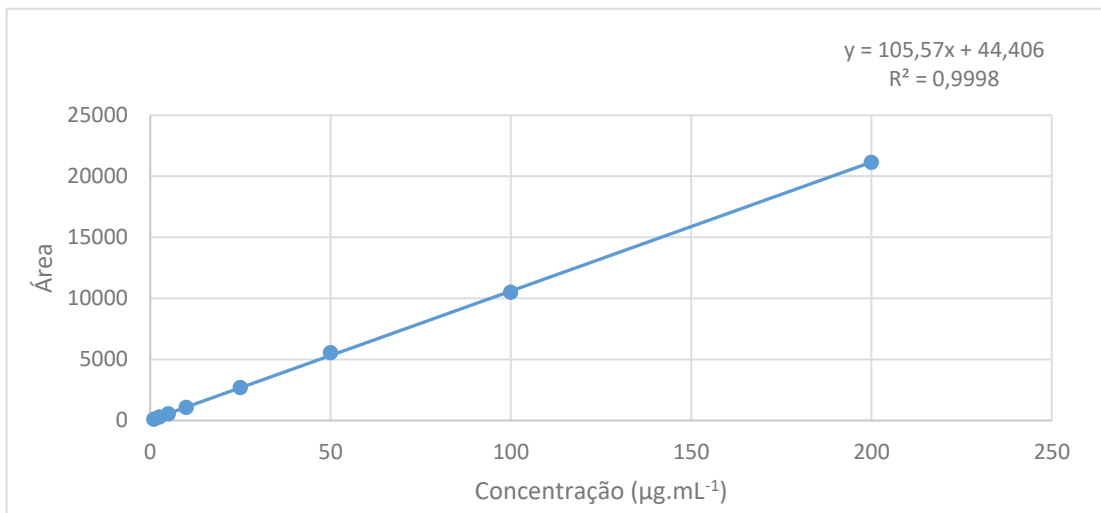
A cumarina e o ácido o-cumárico foram quantificados a partir das curvas de calibração apresentadas pelas FIGURA 2 e FIGURA 3. As curvas foram feitas com os padrões de cumarina e ácido o-cumárico, visto que foram as substâncias identificadas no extrato através da análise por CLAE-DAD.

FIGURA 2 - CURVA ANALÍTICA OBTIDA POR CLAE-DAD PARA O PADRÃO DE CUMARINA



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 3 - CURVA ANALÍTICA OBTIDA POR CLAE-DAD PARA O PADRÃO DE ÁCIDO O-CUMÁRICO

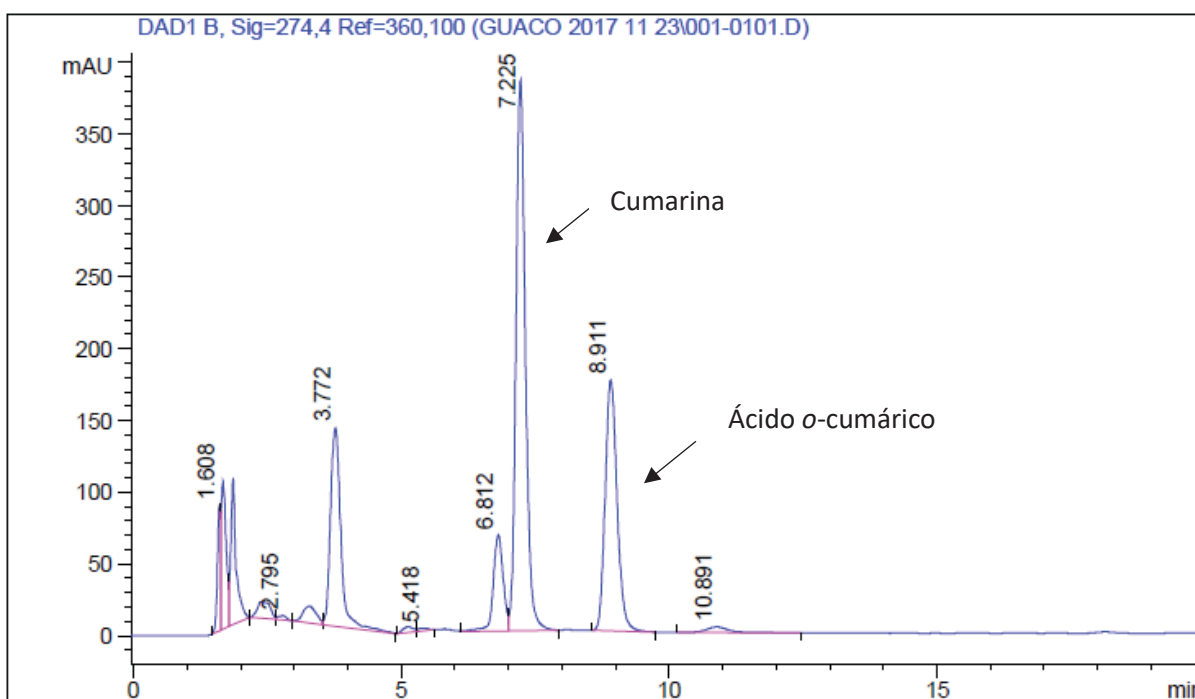


FONTE: O autor (2018).

A faixa de concentração utilizada foi de 1 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguindo o método de GASPARETTO (2010). As curvas apresentaram linearidade e puderam ser utilizadas com segurança para a determinação de cumarina e ácido o-cumárico em extrato hidroalcoólico de guaco, além de apresentar grande eficiência de regressão, com valores de  $R > 0,9998$ .

A FIGURA 4 traz o cromatograma obtido EHFG que apresentou dois picos mais intensos com tempos de retenção de 7,2 e 8,9 min que foram atribuídos a cumarina e o ácido *o*-cumárico. Os demais sinais não foram identificados. No EHFG, a cumarina e o ácido *o*-cumárico tiveram concentrações de  $56,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $25,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

FIGURA 4 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHFG



FONTE: O autor (2018).

Cromatograma obtido conforme método descrito por Gasparetto (2010).

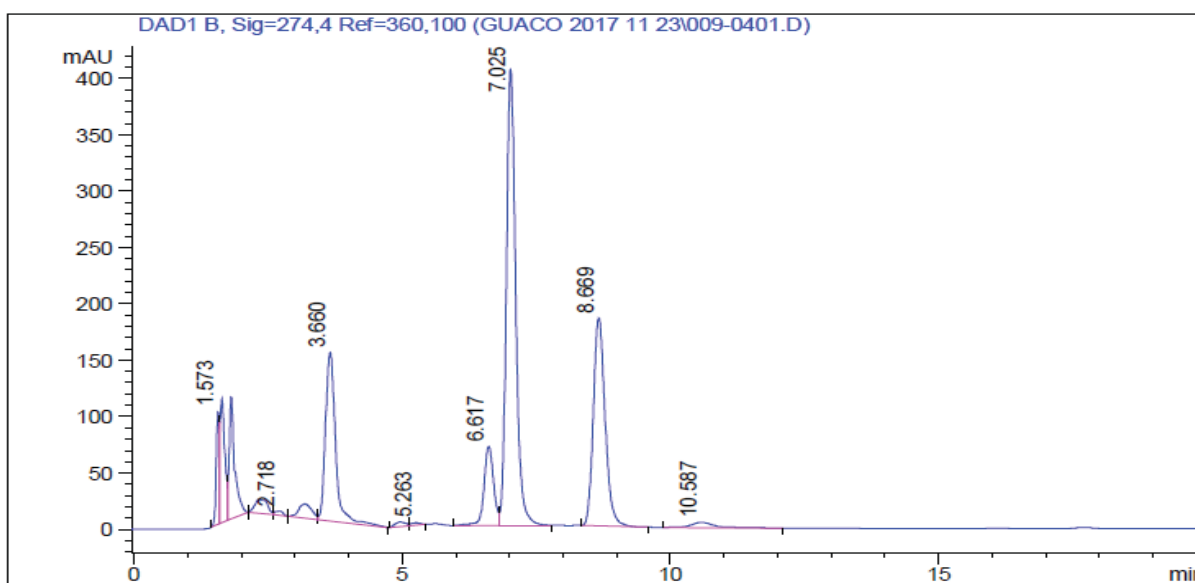
NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:0,1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; detecção: 274 nm; volume de injeção:  $20 \mu\text{L}$ . Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico de folhas de guaco (EHFG).

### 5.2.1 Análises dos extratos submetidos aos testes de estresse

Os extratos submetidos a condições de estresse foram identificados como EHA, EHB, EHO, EHL e EHC (QUADRO 4) e posteriormente filtrados. Esses extratos foram submetidos à análise por CLAE-DAD e tiveram a cumarina e o ácido *o*-cumárico quantificados. As figuras a seguir mostram os perfis cromatográficos nos tempos das últimas coletas das condições ácida, básica, oxidante e luz (15º dia), e calor (30º dia).

Observa-se na FIGURA 5 que as amostras da condição ácida não mostraram alterações significativas nas análises por CLAE-DAD, visto que as concentrações de cumarina e de ácido *o*-cumárico, aumentaram de uma forma muito branda. As concentrações de cumarina e ácido *o*-cumárico foram  $59,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $26,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

FIGURA 5 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHA (15º DIA)

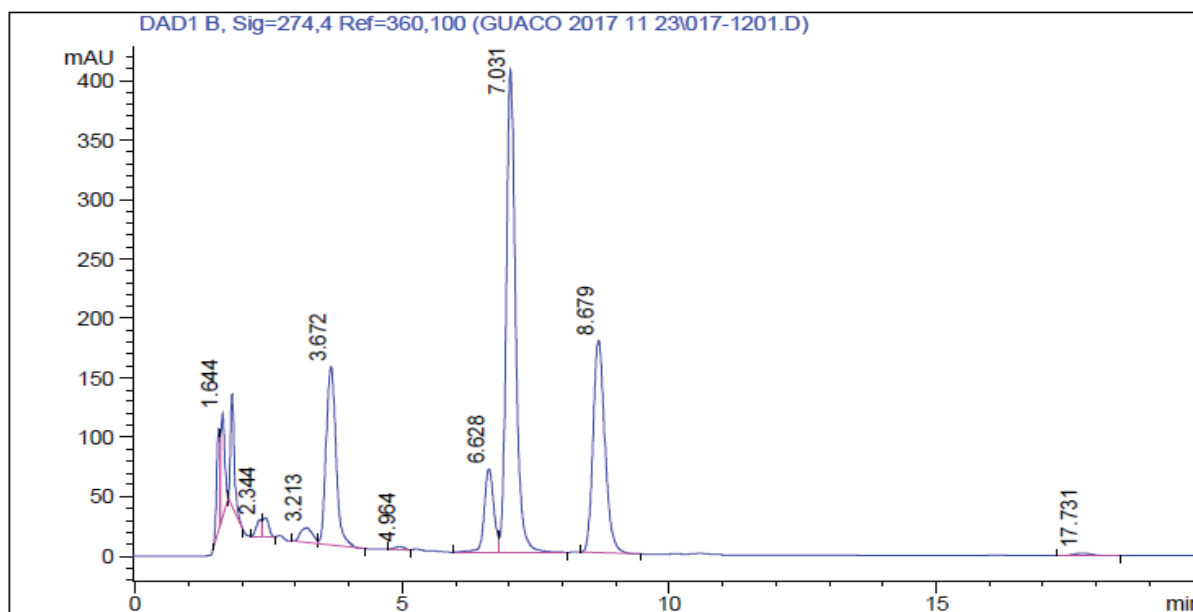


FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:0,1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ ; detecção: 274 nm; volume de injeção:  $20 \mu\text{L}$ . Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico ácido (EHA).

As amostras submetidas a estresse em condição básica, cujo cromatograma está mostrado na FIGURA 6, também mostraram alterações que pudessem ser quantificadas por CLAE-DAD, porém foram alterações muito brandas. As concentrações de cumarina e ácido *o*-cumárico foram de  $59,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $25,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente, permanecendo próximas às do EHFG.

FIGURA 6 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHB (15º DIA)



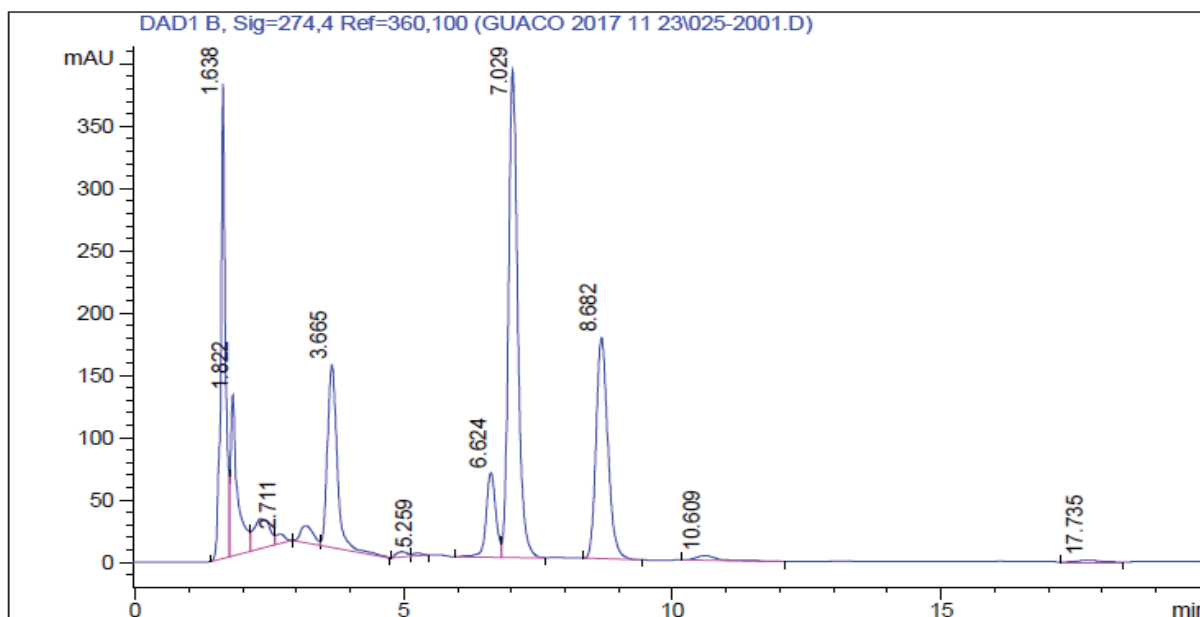
FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:0,1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico básico (EHB).

Para as amostras da condição oxidante, cujo cromatograma obtido está mostrado pela FIGURA 7, as concentrações de cumarina e ácido o-cumárico permaneceram inalteradas, com valores de 56,7 µg.mL<sup>-1</sup> e 25,2 µg.mL<sup>-1</sup>.



FIGURA 7 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHO (15º DIA)

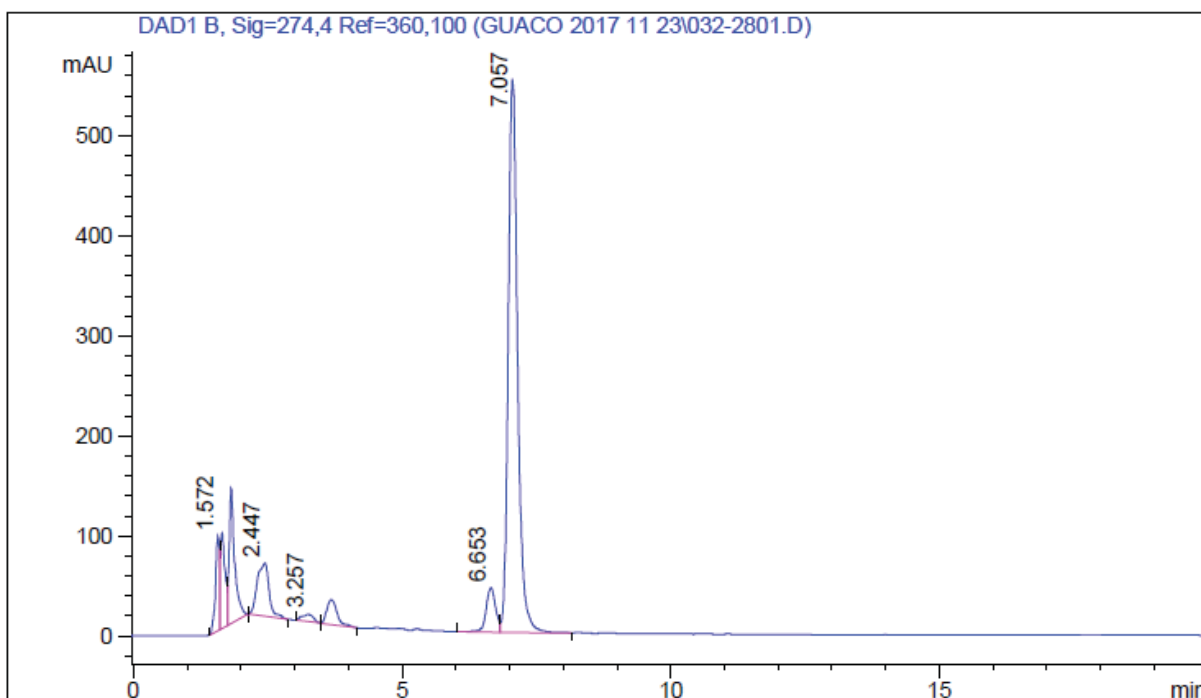


FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:0,1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico oxidado (EHO).

O perfil cromatográfico das amostras expostas à luz foi o que apresentou alterações perceptíveis nas análises por CLAE-DAD. Observa-se no cromatograma que o pico do ácido *o*-cumárico não está mais presente e a área do pico da cumarina aumentou proporcionalmente frente a redução do ácido *o*-cumárico. A concentração de cumarina foi de 81,0 µg.mL<sup>-1</sup> e a concentração do ácido *o*-cumárico foi de zero. Isto pode ser explicado, pois o ácido *o*-cumárico, em presença de luz, pode transformar-se em cumarina, seguindo a rota metabólica das cumarinas, apresentado na Figura 9 (CZELUSNIAK et al., 2012).

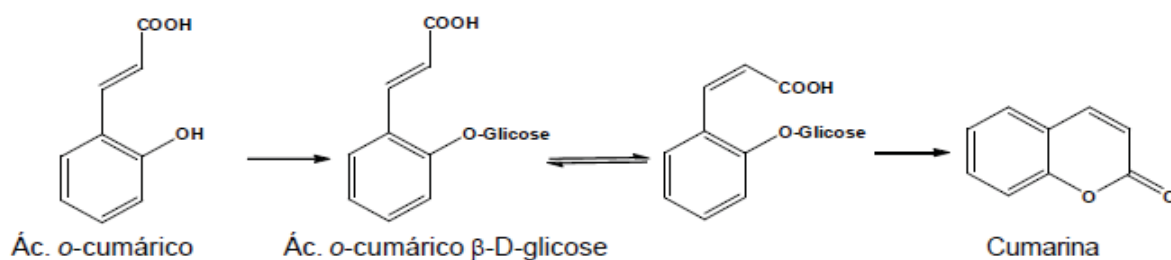
FIGURA 8 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHL (15º DIA)



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:0,1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto a luz (EHL).

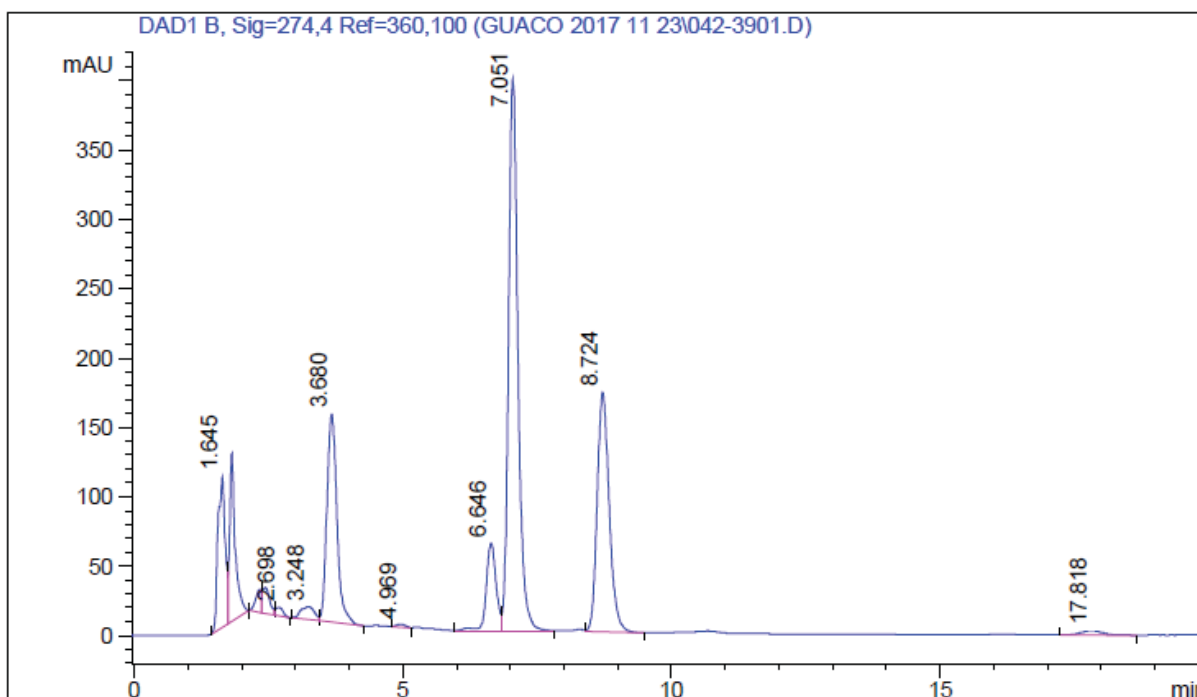
FIGURA 9 - ROTA METABÓLICA DA TRANSFORMAÇÃO DO ÁCIDO O-CUMÁRICO EM CUMARINA



FONTE: Adaptado de CZELUSNIAK et al. (2012).

A FIGURA 10 traz o perfil cromatográfico das amostras expostas ao calor e observa-se que não houve alterações perceptíveis na análise por CLAE-DAD. As concentrações de cumarina e ácido o-cumárico foram de 58,5 µg.mL<sup>-1</sup> e 25,0 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente ATABELA 1 e TABELA 2 trazem a relação de todas as concentrações obtidas de cumarina e de ácido o-cumárico nas amostras de extrato.

FIGURA 10 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EHC (30º DIA)



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: água/metanol/acetonitrila/ácido fórmico (65:30:5:0,1 v/v/v/v); eluição isocrática; fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; detecção: 274 nm; volume de injeção: 20 µL. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto ao calor (EHC).

TABELA 1 – TEOR DE CUMARINA EM µg.mL<sup>-1</sup> EM AMOSTRAS DE EXTRATO ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES DE EXTRESSE EM DIFERENTES TEMPOS

Condição	EFGH	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Ácida	56,6	59,9	60,7	59,9	59,2	59,1	59,1	59,1	59,1	-	-	-
Básica	56,6	60,0	59,8	60,5	59,1	59,6	59,6	60,3	59,6	-	-	-
Oxidante	56,6	57,9	57,0	56,4	56,8	57,1	56,7	56,4	56,7	-	-	-
Luz	56,6	56,5	69,3	84,1	85,1	84,7	82,2	82,9	81,0	-	-	-
Térmica	56,6	56,4	57,8	57,6	58,3	57,7	58,4	57,5	58,0	58,2	58,2	58,5

FONTE: O autor (2018).

Legenda: T= Tempos de coleta (T7 = 15 dias para EHA, EHB, EHO, EHL; T10 = 30 dias para EHC).

TABELA 2 - TEOR DE ÁCIDO O-CUMÁRICO EM  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  EM AMOSTRAS DE EXTRATO ANTES E APÓS A EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES DE EXTRESSE EM DIFERENTES TEMPOS

Condição	EHFG	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Ácida	25,2	26,5	27,0	26,7	26,4	26,4	26,0	26,0	26,3	-	-	-
Básica	25,2	26,2	26,4	26,5	25,6	25,8	25,8	26,1	25,7	-	-	-
Oxidante	25,2	25,8	25,3	25,1	25,3	25,4	25,0	25,0	25,2	-	-	-
Luz	25,2	25,0	18,0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Térmica	25,2	24,9	25,5	25,3	25,5	25,3	25,3	25,0	25,5	25,2	25,3	25,0

FONTE: O autor (2018).

Legenda: T= Tempos de coleta (T7 = 15 dias para EHA, EHB, EHO, EHL; T10 = 30 dias para EHC).

Observou-se que todas as amostras, exceto as expostas à luz, não apresentaram alterações para se concluir uma degradação. As amostras expostas a luz variaram significativamente os teores de ácido o-cumárico e cumarina, aumentando os níveis de cumarina do extrato. Considerando este fato, e o fitoterápico produzido a partir do guaco, este quando exposto a luz pode sofrer alteração, podendo ocorrer alguma mudança nos efeitos do medicamento.

### 5.3 ANÁLISES ATRAVÉS DE CLUE-Q-TOF

As amostras de EHFG e das frações submetidas aos diferentes estresses químicos e térmico (EHA, EHB, EHO, EHL e EHC) foram analisadas por CLUE-Q-TOF. As condições cromatográficas do método por CLUE-Q-TOF foram adaptadas do método por CLAE-DAD. Todas amostras foram analisadas, tanto no modo positivo de ionização, quanto no negativo. As figuras a seguir mostram os cromatogramas e os espectros de massas obtidos por CLUE-Q-TOF, das amostras submetidas ao estresse nas diferentes condições químicas e térmica (ácido, base, agente oxidante, luz e calor).

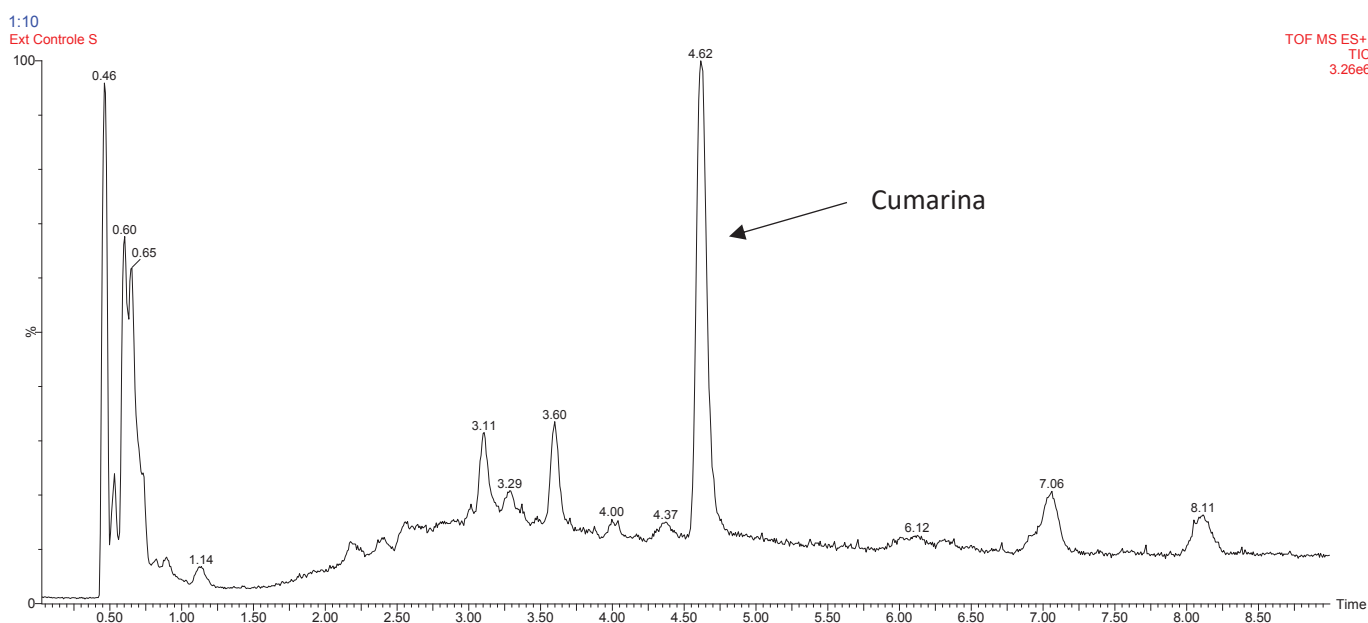
#### 5.3.1 Amostras analisadas pelo modo positivo de ionização

Para as análises cromatográficas, todas as amostras (EHFG, EHA, EHB, EHO, EHL e EHC) foram testadas em diversas concentrações, com o objetivo de obter

o maior número de picos com intensidades aceitáveis. A diluição final escolhida foi 1:10 em metanol/água (50:50 v/v). Além dos cromatogramas, foram obtidos os espectros de massas, com as intensidades dos íons  $m/z$ , a condição final do método foi considerada satisfatória, obtendo uma boa separação entre picos e uma intensidade aceitável dos íons.

A FIGURA 11 traz o cromatograma do EHFG. Foram testadas diferentes diluições do extrato e a diluição 1:10 (v/v) foi considerada a melhor para a análise, pois traz uma contagem de íons satisfatória, não saturando nenhum íon do espectro. Como esperado, o pico de maior intensidade é o da cumarina em 4,62 min. A FIGURA 12 traz o espectro de massas correspondente ao cromatograma mostrado pela FIGURA 11. O espectro apresentado confirma o íon 147,0416 como sendo a cumarina, apresentando uma das maiores intensidades entre os íons da amostra.

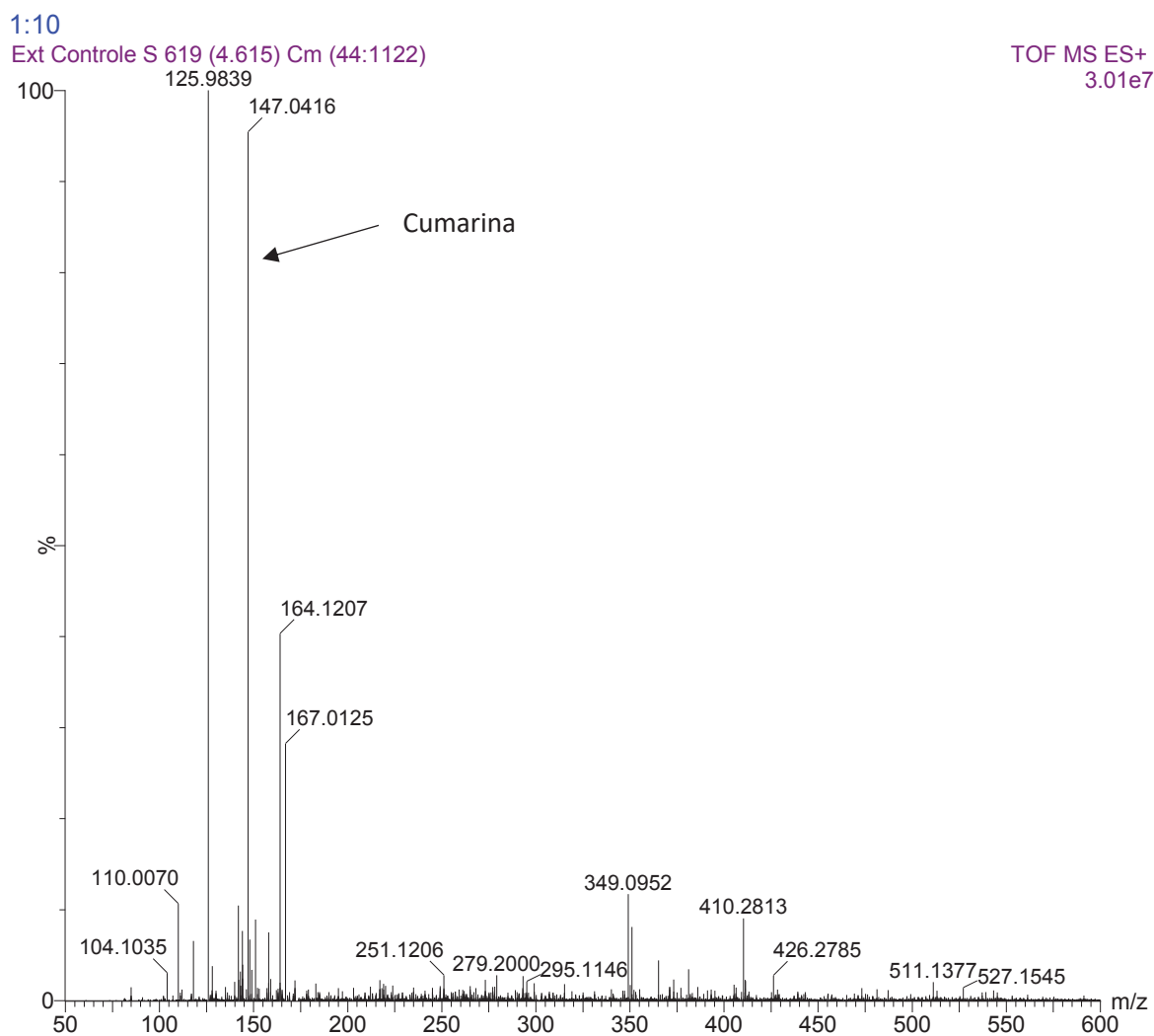
FIGURA 11 - CROMATOGRAMA DO EHFG - MODO POSITIVO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: metanol/água (0,05% de ácido fórmico); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; volume de injeção: 3  $\mu\text{L}$ ; modo de detecção dos dados:  $\text{MS}^E$ ; modo positivo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico de folhas de guaco (EHFG).

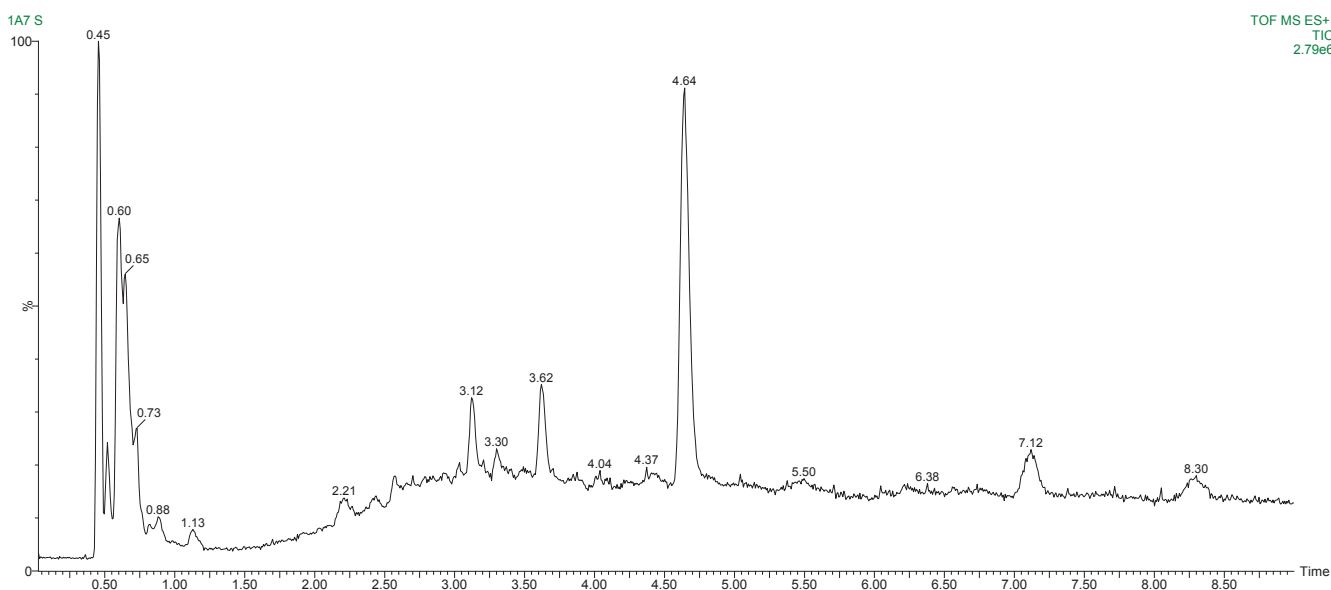
FIGURA 12 - ESPECTRO DE MASSAS DO EHFG NO MODO POSITIVO DE IONIZAÇÃO



FONTE: O autor (2018).

As figuras 13, 14, 15, 16 e 17 mostram os cromatogramas das amostras de EHFG após o tratamento com diferentes agentes químicos, físicos e condições forçadas, após 15 dias para EHA, EHB, EHO e EHL, e 30 dias para EHC.

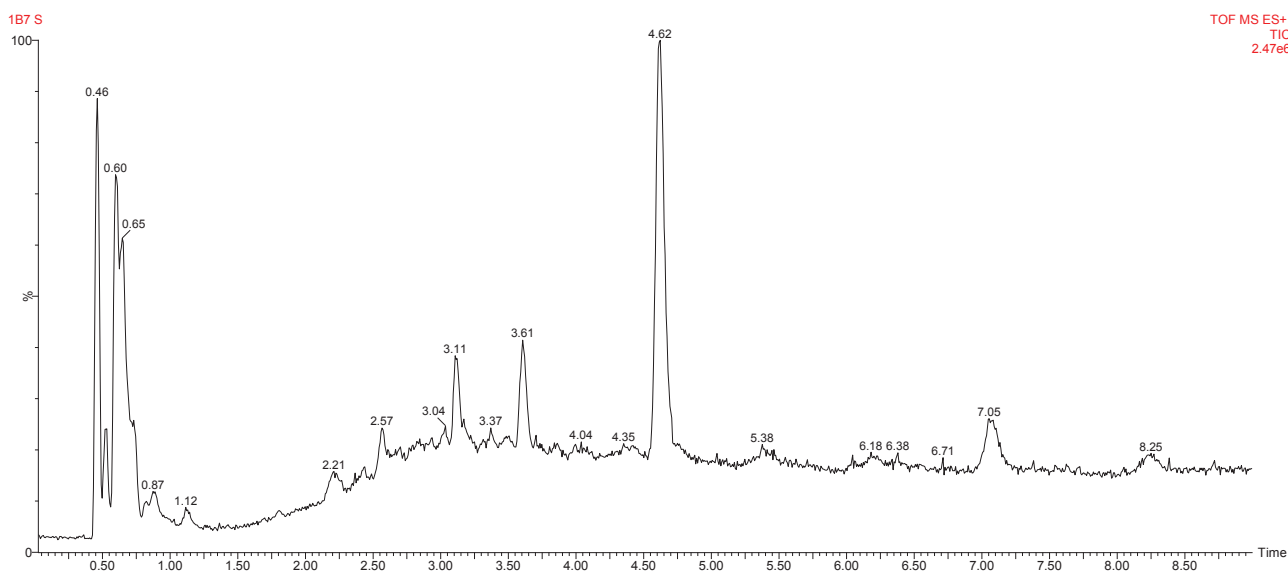
FIGURA 13 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHA (15º DIA) - MODO POSITIVO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: metanol/água (0,05% de ácido fórmico); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; volume de injeção: 3  $\mu\text{L}$ ; modo de detecção dos dados:  $\text{MS}^E$ ; modo positivo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico ácido (EHA).

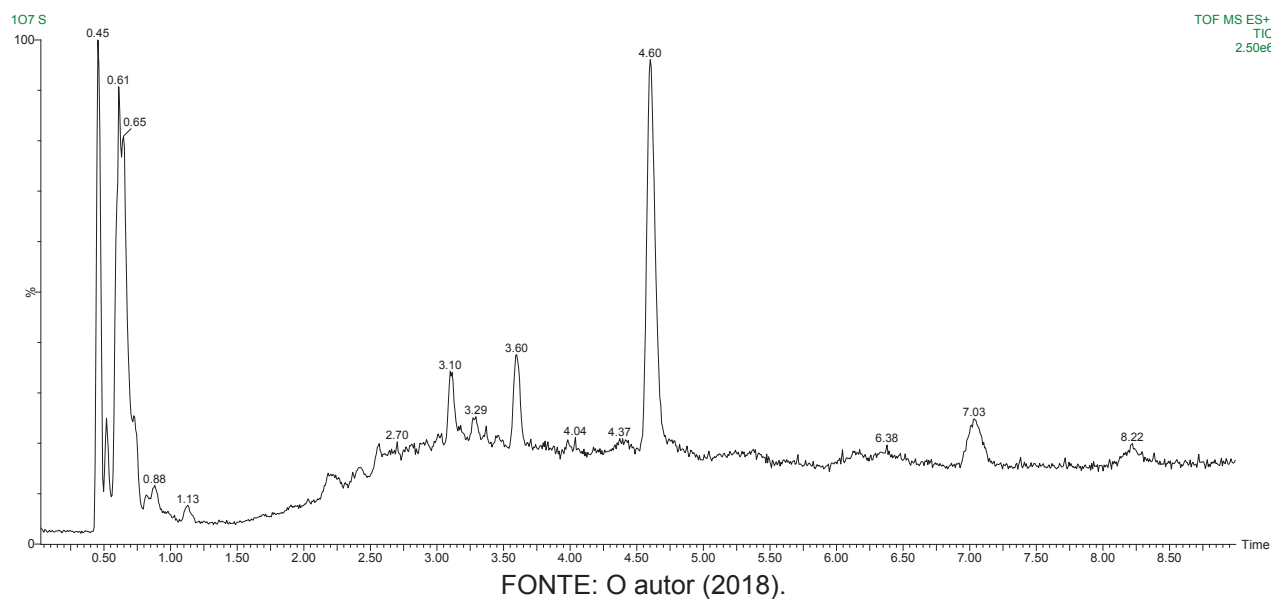
FIGURA 14 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHB (15º DIA) - MODO POSITIVO



FONTE: O autor (2018).

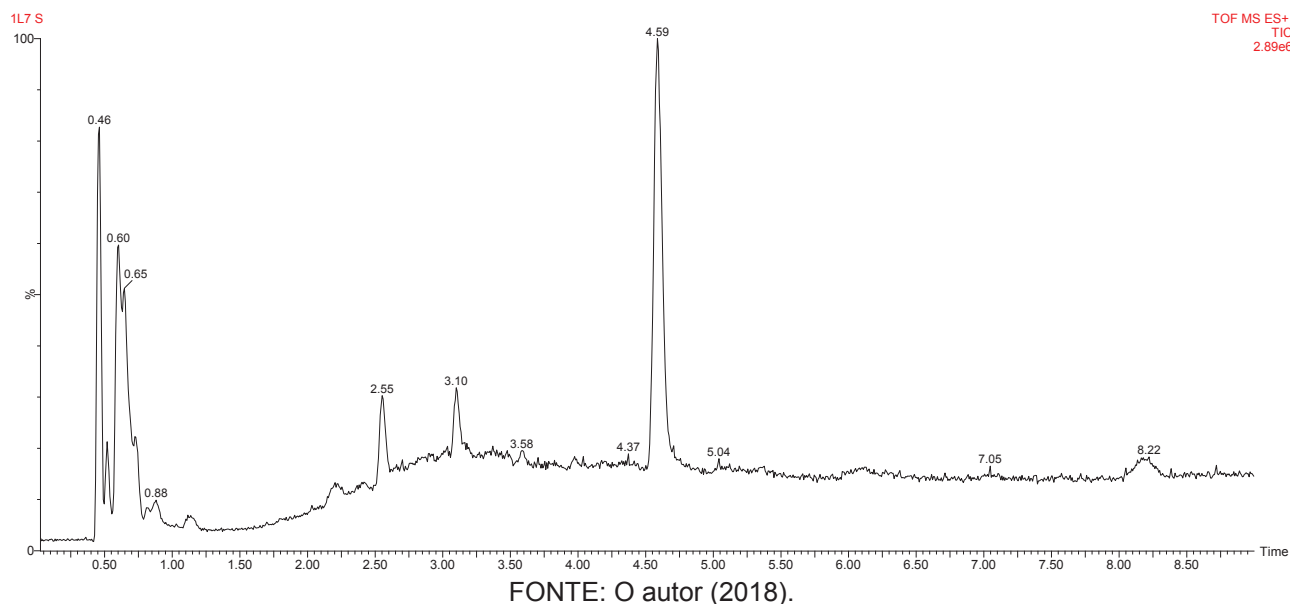
NOTA: Fase móvel: metanol/água (0,05% de ácido fórmico); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; volume de injeção: 3  $\mu\text{L}$ ; modo de detecção dos dados:  $\text{MS}^E$ ; modo positivo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico básico (EHB).

FIGURA 15 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHO (15º DIA) - MODO POSITIVO



NOTA: Fase móvel: metanol/água (0,05% de ácido fórmico); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; volume de injeção: 3  $\mu\text{L}$ ; modo de detecção dos dados:  $\text{MS}^E$ ; modo positivo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto à agente oxidante (EHO).

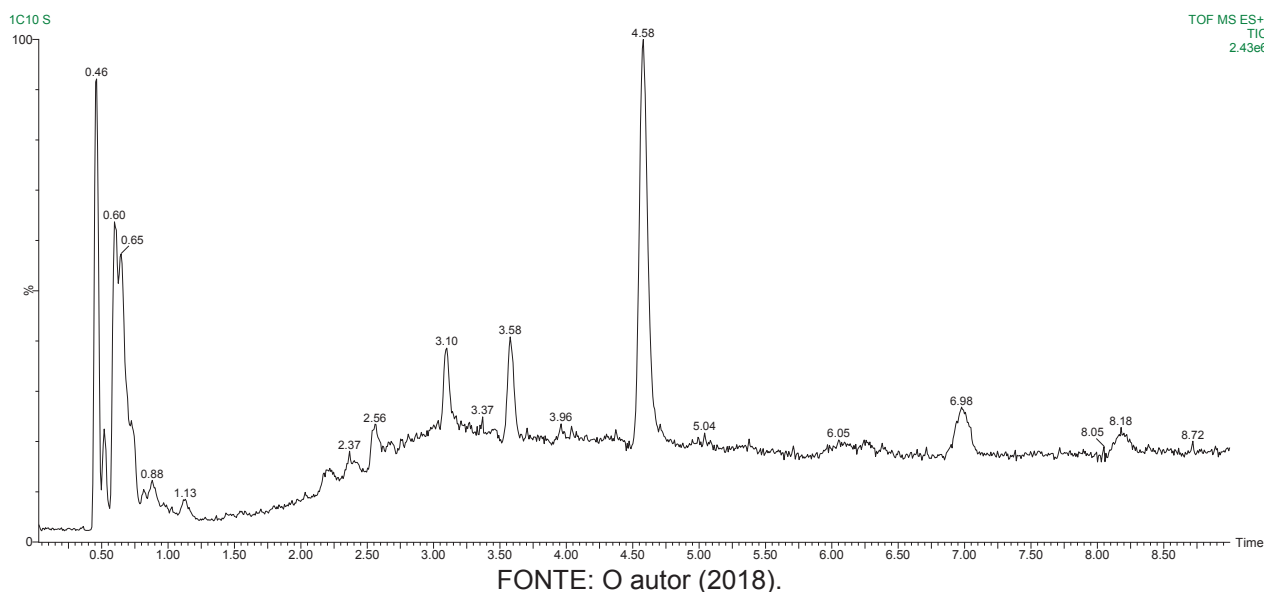
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHL (15º DIA) - MODO POSITIVO



NOTA: Fase móvel: metanol/água (0,05% de ácido fórmico); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; volume de injeção: 3  $\mu\text{L}$ ; modo de detecção dos dados:  $\text{MS}^E$ ; modo positivo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto à luz (EHL).



FIGURA 17 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHC (30º DIA) - MODO POSITIVO



NOTA: Fase móvel: metanol/água (0,05% de ácido fórmico); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ; volume de injeção: 3  $\mu\text{L}$ ; modo de detecção dos dados:  $\text{MS}^E$ ; modo positivo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto ao calor (EHC).

As figuras apresentadas anteriormente mostram os perfis cromatográficos das amostras analisadas por CLUE-Q-TOF. Comparando os cromatogramas finais, com o cromatograma inicial do extrato, não é possível verificar alterações em todas as substâncias, pois vários compostos presentes no extrato estão em baixas concentrações e podem não aparecer no cromatograma, porém estão presentes no espectro de massas.

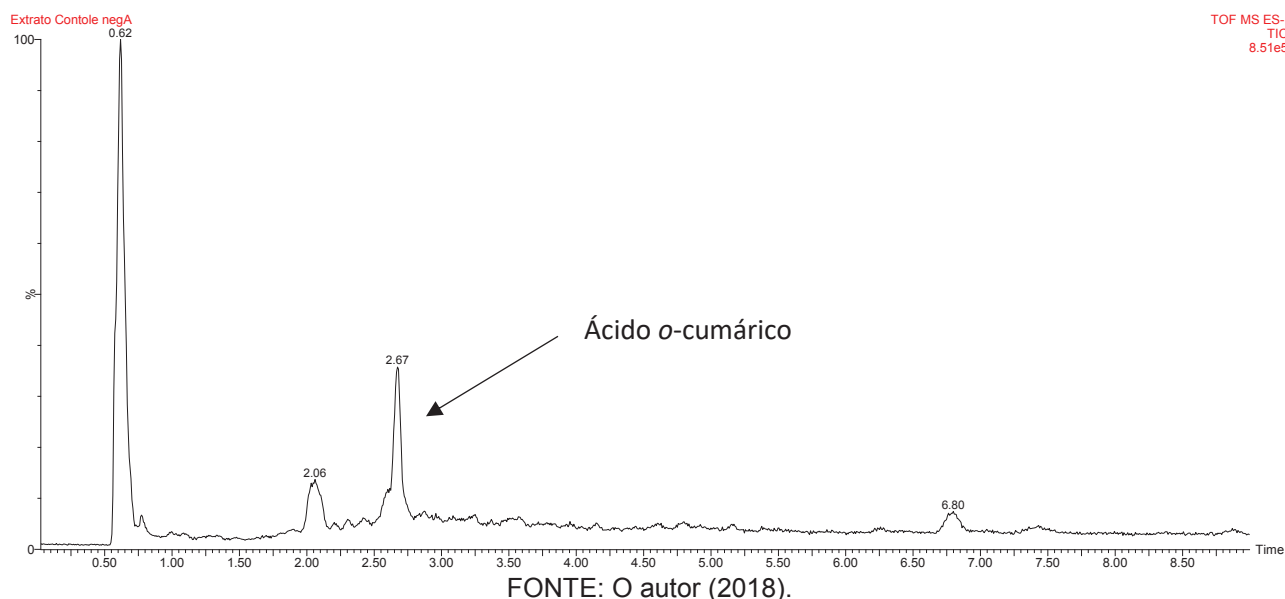
O extrato que passou pela degradação forçada por luz mostrou um perfil diferente dos demais, onde o pico de tempo de retenção de aproximadamente, 7,0 min, está ausente. Isso é explicado da mesma maneira que foi explicada no item 5.2.1, onde o ácido *o*-cumárico se converte em cumarina.

### 5.3.2 Amostras analisadas pelo modo negativo de ionização.

Os extratos foram analisados também pelo modo negativo de ionização, seguindo o item 4.8, para o preparo e análise das amostras. O método realizado se mostrou satisfatório, porém, apresentou uma quantidade menor de sinais, o que pode

ser justificado pela não ionização das substâncias presentes pelo modo negativo. Na FIGURA 18 é mostrado o cromatograma do extrato inicial e a FIGURA 19 traz o espectro de massas correspondente ao cromatograma apresentado pela FIGURA 18.

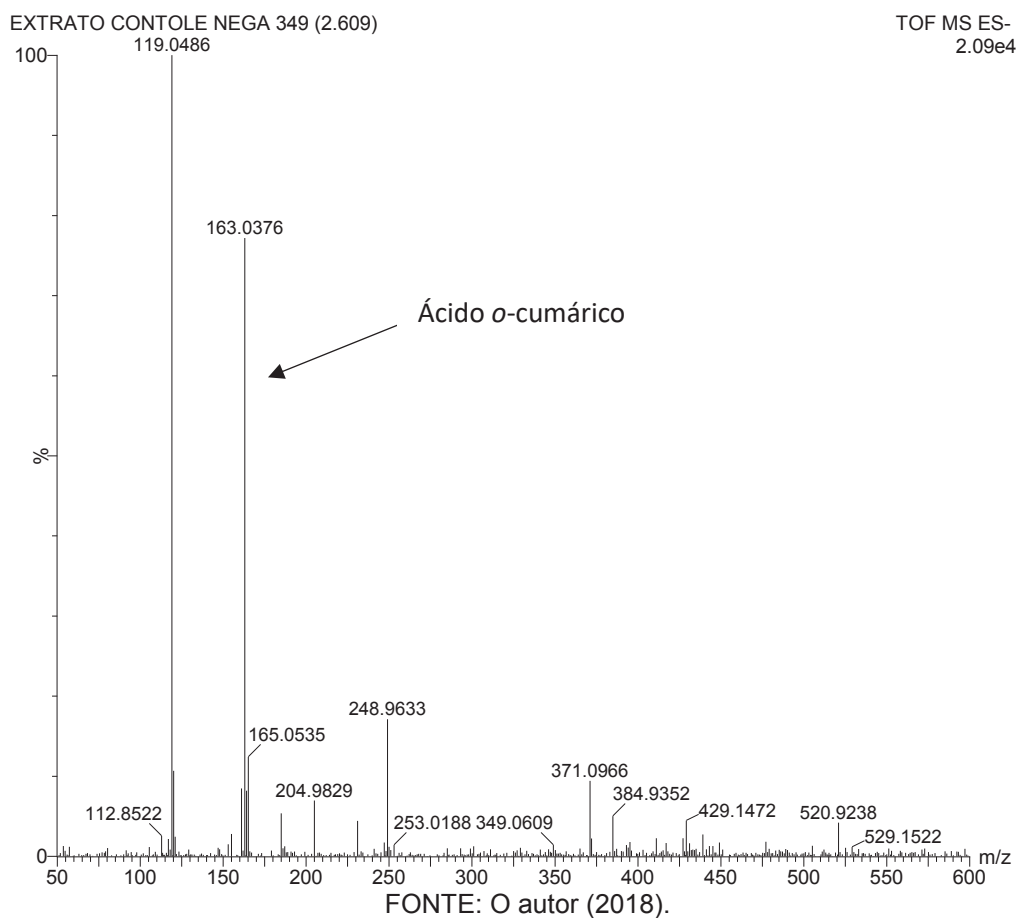
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHFG - MODO NEGATIVO



NOTA: Fase móvel: Metanol/Água (5 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400 µL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 3 µL; modo de detecção dos dados: MS<sup>E</sup>; modo negativo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico de folhas de guaco (EHFG).

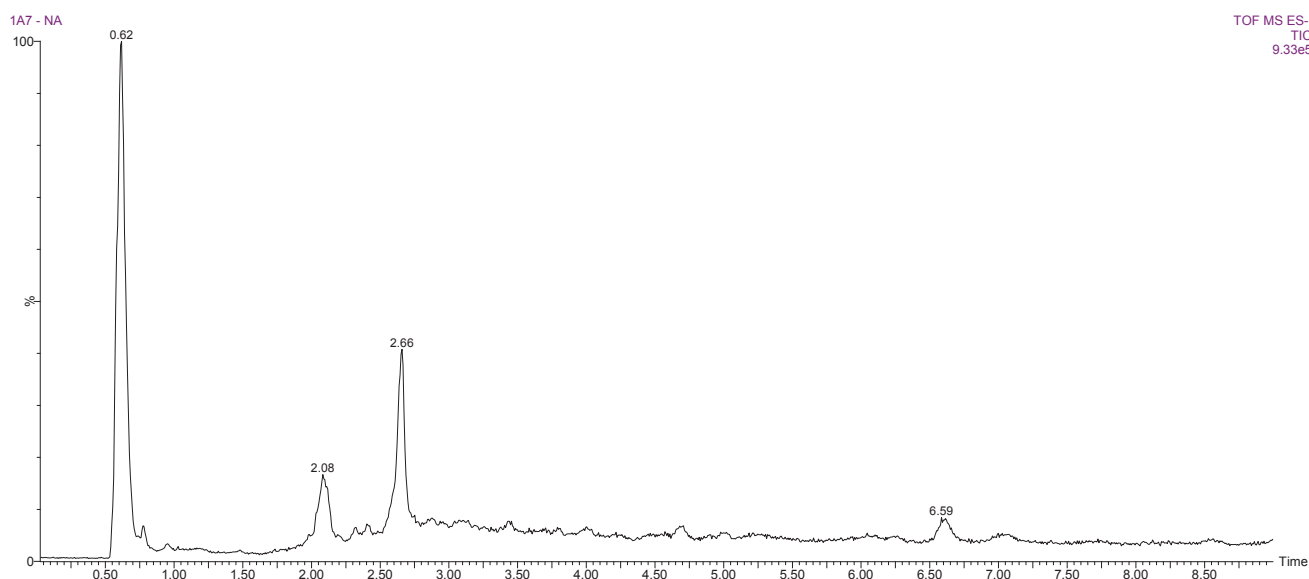
O sinal que mais se sobressai no cromatograma é o de tempo de retenção de 2,6 min, proveniente do ácido *o*-cumárico. Na ionização no modo negativo, o ácido *o*-cumárico se ioniza muito melhor, por ter mais facilidade de perder hidrogênio, apresentando maior contagem de íons que no modo positivo.

FIGURA 19 - ESPECTRO DE MASSAS DO EHFG NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO



Observou-se que mesmo apresentando menos sinais que o modo positivo, o espectro de massas contém uma quantidade muito alta de íons e necessita de uma análise detalhada de cada uma das intensidades dos íons  $m/z$ . As figuras 20, 21, 22, 23 e 24, trazem os cromatogramas dos extratos EHA, EHB, EHO, EHL (15° dia) e EHC (30° dia).

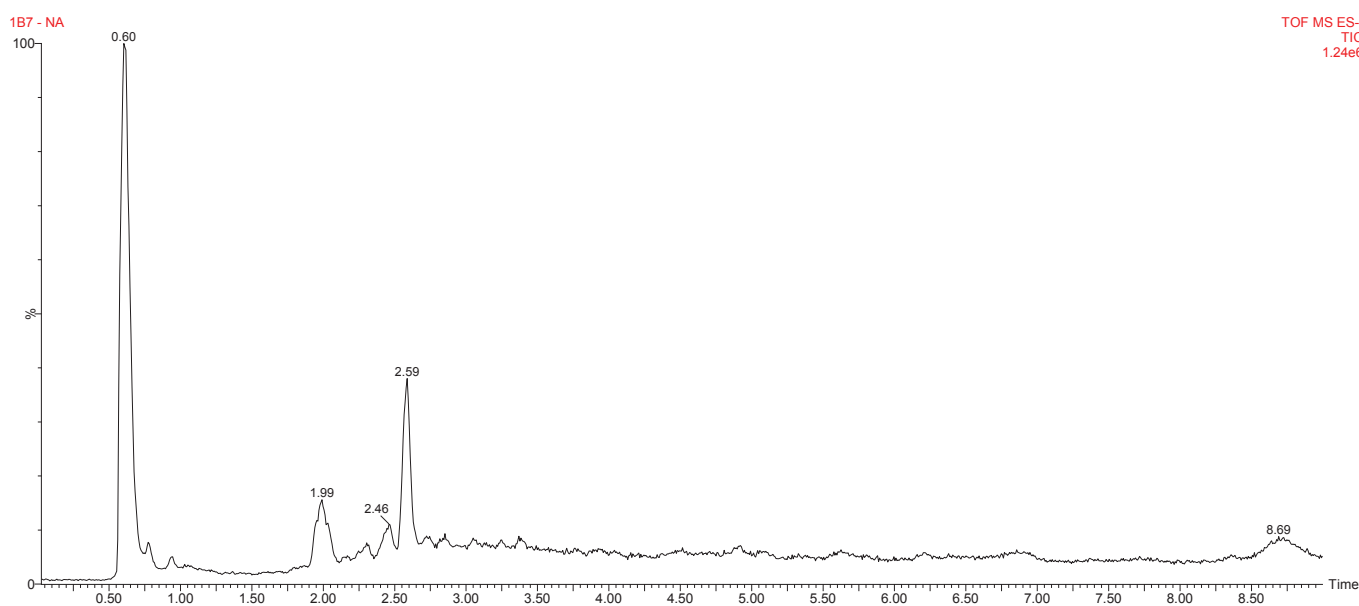
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHA (15º DIA) - MODO NEGATIVO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: metanol/água (5 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400 µL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 3 µL; modo de detecção dos dados: MS<sup>E</sup>; modo negativo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico ácido (EHA).

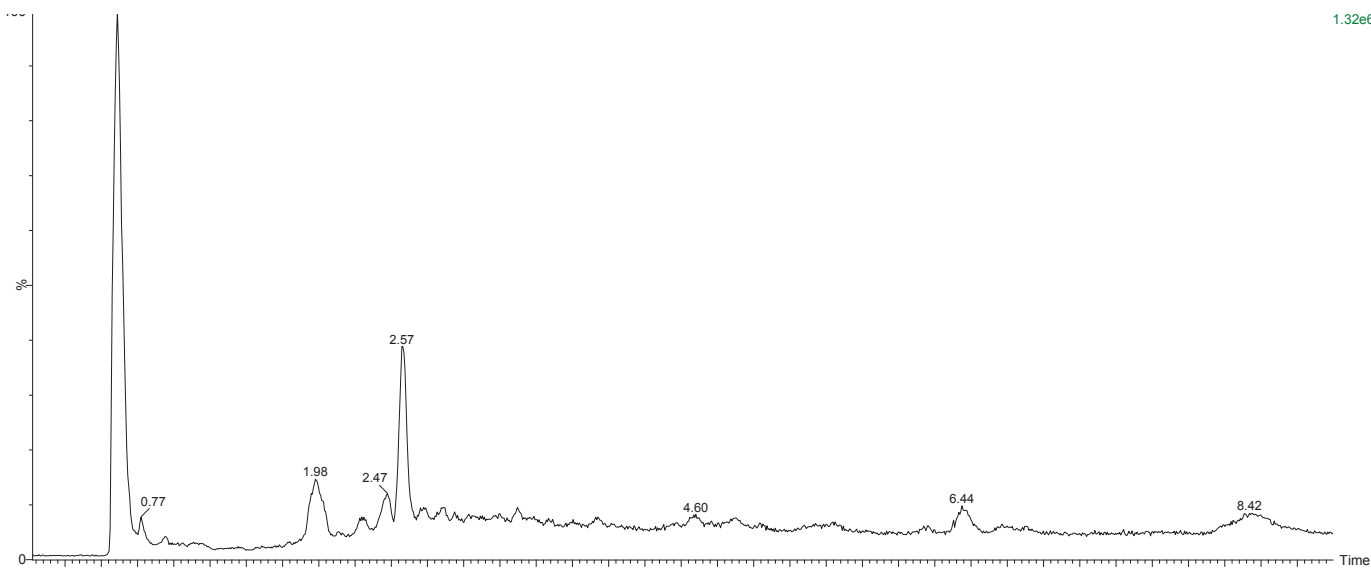
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHB (15º DIA) - MODO NEGATIVO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: metanol/água (5 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400 µL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 3 µL; modo de detecção dos dados: MS<sup>E</sup>; modo negativo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico básico (EHB).

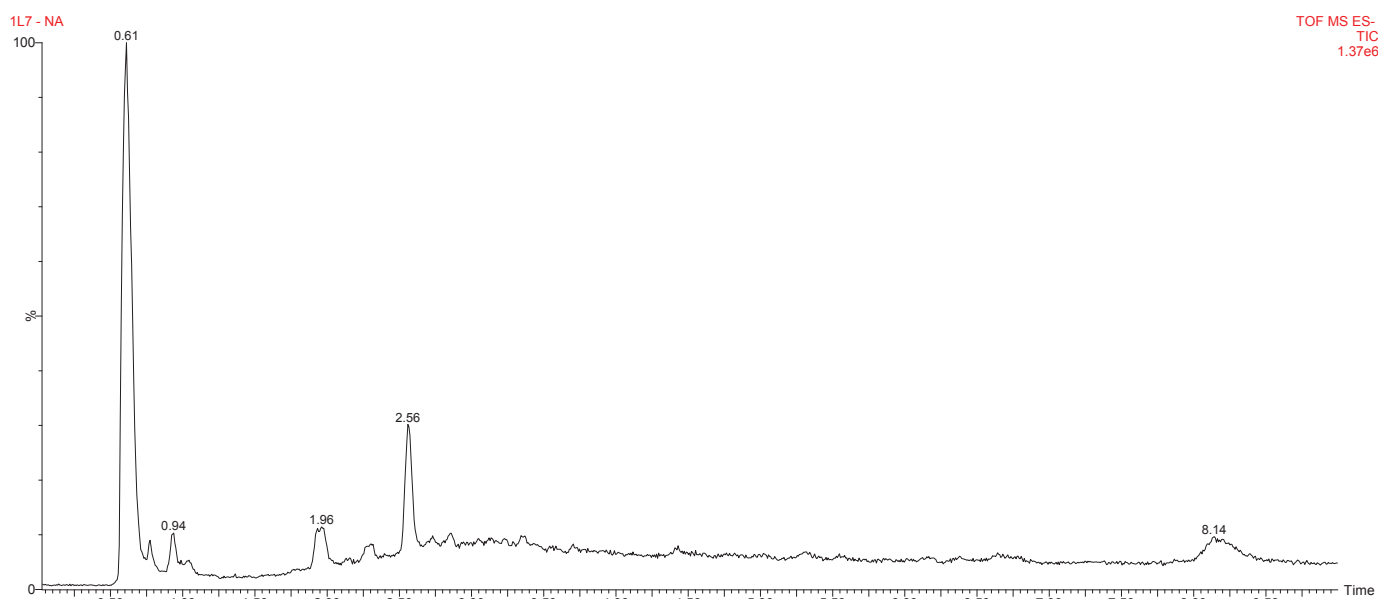
FIGURA 22 - CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHO (15º DIA) - MODO NEGATIVO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: metanol/água (5 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400 µL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 3 µL; modo de detecção dos dados: MS<sup>E</sup>; modo negativo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto à agente oxidante (EHO).

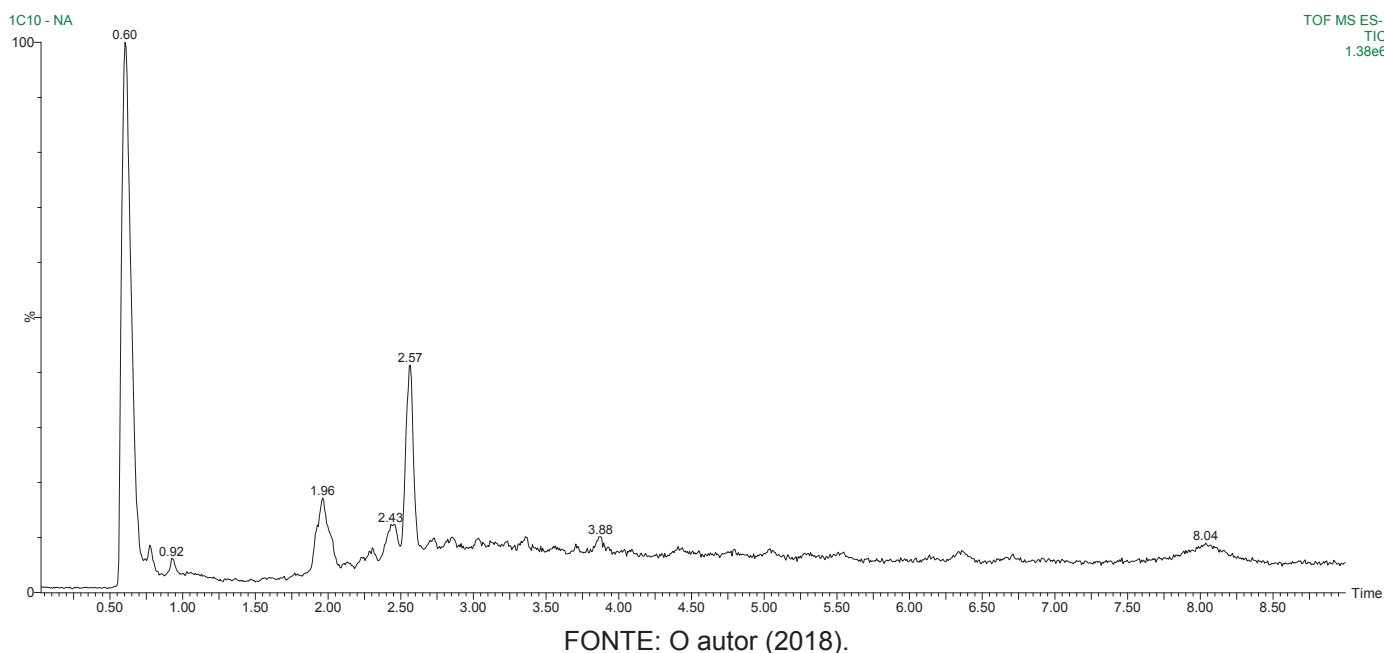
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHL (15º DIA) - MODO NEGATIVO



FONTE: O autor (2018).

NOTA: Fase móvel: metanol/água (5 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400 µL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 3 µL; modo de detecção dos dados: MS<sup>E</sup>; modo negativo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto à luz (EHL).

FIGURA 24 – CROMATOGRAMA CLUE-Q-TOF DO EHC (30° DIA) - MODO NEGATIVO



NOTA: Fase móvel: metanol/água (5 mmol.L<sup>-1</sup> de formiato de amônio); eluição gradiente: 0 a 1,5 min: A=90%; Tempo 1,5 a 8,5 min: A=70%; Tempo 8,5 a 10 min: A= 70% a 90%; fluxo de 400 µL min<sup>-1</sup>; volume de injeção: 3 µL; modo de detecção dos dados: MS<sup>E</sup>; modo negativo de ionização. Amostra utilizada: Extrato hidroalcoólico exposto ao calor (EHC).

Os espectros das amostras EHA, EHB, EHO, EHL e EHC analisados no modo negativo não mostraram mudanças significativas quando são comparados os espectros do tempo final (Tf=15 dias para EHA, EHB, EHL e EHO, e 30 dias para EHC) com o tempo inicial (T0). Para evidenciar possíveis diferenças nos espectros de massas obtidos, tanto no modo positivo quanto no modo negativo, optou-se por utilizar um tratamento estatístico quimiométrico, na busca de um método para diferenciar cada extrato obtido nos processos de degradação.

#### 5.4 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS PARA AS ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Os espectros de todas as amostras obtidos pelo software MassLynx da Waters Corporation, antes de passarem pelo modelo quimiométrico, foram tratados através do software MarkerLynx XS Application Manager, que processa os dados

multivariados complexos de CLAE-EM, CLAE-EM/EM, CG-EM, CG-EM/EM para os estudos quimiométricos.

O método utilizado para o tratamento das amostras, teve os parâmetros de alinhamento e detecção de picos das amostras ajustados da seguinte maneira:

**Tipo de análise:** foi selecionada a detecção de pico, com o objetivo de detectar todos os picos das massas das amostras.

**Tempo de retenção inicial e final:** conforme os cromatogramas obtidos, foi definido o intervalo de 0-9 minutos, pois o trabalho tem como objetivo analisar o cromatograma como um todo.

**Massa máxima e mínima:** a faixa definida foi de 50 a 600 Da.

**Janela XIC (Da):** com o objetivo de limitar a precisão de massa (Da) dos dados adquiridos, este parâmetro foi ajustado duas vezes a massa de precisão do instrumento UPLC-HRMS que é de 0,01 Da. Portanto o valor foi 0,02 Da.

**Usar tempo de retenção relativo:** como não foi utilizado padrão interno nas análises e essa função diz respeito ao tempo deste padrão, esse parâmetro não foi selecionado.

**Largura do pico a 5% da altura:** este parâmetro foi deixado no automático, onde o software determina a largura do pico e integra sua área.

**Ruído de linha de base pico a pico:** parâmetro deixado no automático também. O ruído de linha de base afeta diretamente o número de massas detectadas e quanto maior seu valor, menor será a quantidade de massas em baixa intensidade.

**Aplicar alisamento:** não foi aplicado alisamentos em nenhum momento. Este parâmetro aplica suavizações nos picos das amostras.

**Limite de intensidade de marcador:** define um nível mínimo de intensidade de alguma massa encontrada nos espectros para ser considerado como marcador. O valor padrão foi de 100, onde as massas com intensidade menor que 100 foram consideradas como ruído.

**Janela de massa:** define a tolerância de massa para que um marcador identificado em uma amostra seja definido como o mesmo nas demais amostras. Utilizou-se 0,05 Da para evitar identificações duplicadas da mesma substância.

**Janela de tempo de retenção:** define o tempo de retenção em minutos que indicará se um marcador é o mesmo em todas as amostras. Foi utilizado a janela de 0,2 minutos para todas as amostras.

**Nível de eliminação ruído:** elimina automaticamente ruído base durante a detecção de um pico. Quanto maior o valor, picos de menor intensidade são mais eliminados da detecção. Foi definido um valor de 6, após vários testes.

**Deisotope data:** remove sinais dos isótopos para evitar que estes picos sejam considerados marcadores. Esse parâmetro foi deixado ativo no método.

Este processamento transformou todos os espectros em um resultado numérico, onde foram relacionadas as massas encontradas, por suas respectivas intensidades. Após o processamento foram encontradas 8833 massas, para as amostras analisadas no modo positivo de ionização. Já para as amostras no modo negativo de ionização foram encontradas 5723 massas.

O total de amostras analisadas foram 44, sendo que para cada condição de degradação foram sete coletas mais o tempo inicial, exceto para a condição térmica que ocorreram 10 coletas mais o tempo inicial. Essas amostras foram organizadas todas em forma de tabela, sempre separadas pelo seu devido modo de ionização e posteriormente transformadas em matriz para a análise quimiométrica.

## 5.5 ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Todas as amostras obtidas por CLUE-Q-TOF foram analisadas quimiometricamente e foram separadas pelos seus respectivos modos de ionização. Ambos modos passaram previamente pelo pré-processamento, realizado pelo software Matlab 7.0.1® (Mathworks).

Foram testados os pré-processamentos como auto escalamento, alisamento, normalização e centrado na média. Eles foram testados em conjunto e separadamente e a escolha foi baseada no menor erro obtido no final do modelo e o que melhor se ajusta aos resultados provenientes dos espectros. O melhor pré-processamento encontrado foi o centrado na média, onde é calculado o valor médio de cada coluna da matriz e este é subtraído das respectivas colunas, tornando as coordenadas de dados mais centralizadas.

Depois de definido os pré-processamentos, foi iniciada a construção dos modelos quimiométricos. Uma vez que a redução da dimensionalidade dos dados é um dos objetivos principais da PCA, a primeira avaliação foi o número de componentes principais (CPs) a serem investigadas e quantas serão ignoradas no

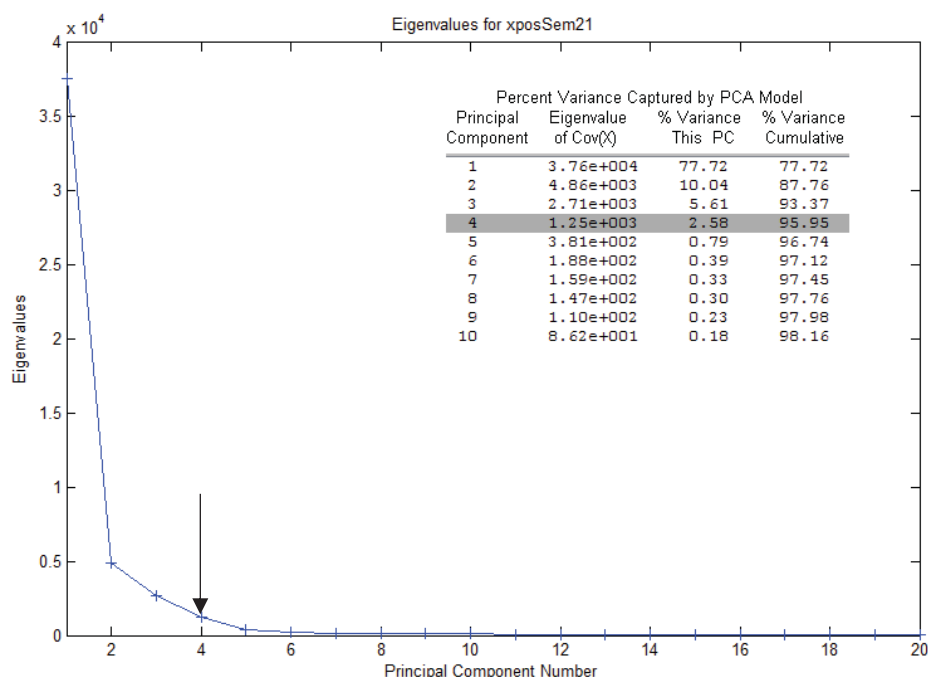


modelo. Foram seguidos alguns critérios nessa escolha do número de componentes principais, como: 1) ignorar as CPs no ponto em que a próxima CP oferecerá um pequeno aumento na variância acumulada explicada (Eigenvalues); 2) incluir todas as CPs até uma porcentagem de variância total explicada, já pré-determinada; 3) ignorar CPs cuja variância explicada seja inferior a 1% quando uma matriz de correlação é utilizada, com a ideia de que tais componentes oferecem pouca informação; 4) ignorar as últimas CPs cujos valores de variância explicada sejam praticamente iguais (FERREIRA et al., 1999).

#### 5.5.1 Análise de componentes principais das amostras do modo positivo de ionização

A escolha do número de CPs a serem investigadas foi feita em função do gráfico de Eigenvalues versus número de CPs, onde, não existe aumento significativo da variância total explicada a partir de alguma determinada CP, determinando assim, o número de CPs a serem investigadas. A FIGURA 25 mostra o gráfico de Eigenvalues versus número de CPs, que é analisado para a escolha das CPs. Para a explicação a totalidade dos dados originais das amostras no modelo, pode-se observar que foi necessário a utilização de 20 CPs, entretanto, a partir da quarta CP (CP4), não há aumento significativo na variância acumulada explicada. Portanto com quatro CPs há a possibilidade de explicar 95,95% da variância acumulada.

FIGURA 25 - GRÁFICO DE EINGENVALUES X NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS  
PARA TODAS AMOSTRAS EM IONIZAÇÃO POSITIVA



FONTE: O autor (2018).

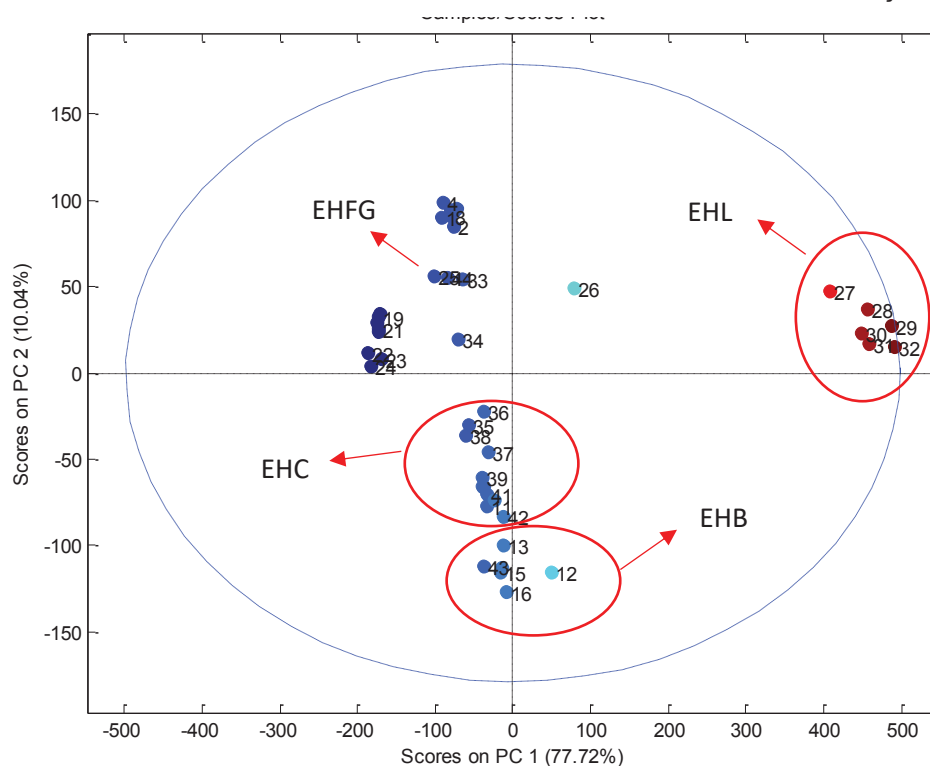
Após a definição do número de CPs para as amostras da ionização positiva, foi construído o gráfico de *scores* a partir dos espectros de massas obtidos das amostras dos extratos de guaco. No presente trabalho, o gráfico de *scores* tem como objetivo diferenciar os extratos que sofreram degradação dos extratos que continuaram sem alterações significativas, após o processo de degradação.

O gráfico de *scores* deve ser analisado a partir da distribuição das amostras em um sistema de coordenadas, criado pelas próprias componentes principais que estão em análise, bem como a variação acumulada que cada uma representa. Cada componente principal traça uma linha de coordenada partindo do ponto zero dividindo o gráfico em quadrantes, que são delimitados por valores positivos e negativos de cada CP.

A FIGURA 26 traz o gráfico de *scores* de todas as amostras de extratos que passaram pelos testes de degradação forçada (EHA, EHB, EHL, EHC, EHO). As amostras 25, 33 e 44 foram consideradas amostras controle, por serem tempos iniciais dos testes de luz e calor e um extrato que não passou por nenhum teste, respectivamente. O gráfico traz a relação entre a CP1 e CP2, onde observa-se que a CP1 explica 77,72% da variância acumulada das amostras e consegue fazer a diferenciação do grupo das amostras expostas a luz (25-32) em relação as demais. A

CP2 explica 10,04% da variância e consegue diferenciar EHC e EHB das demais amostras das outras condições.

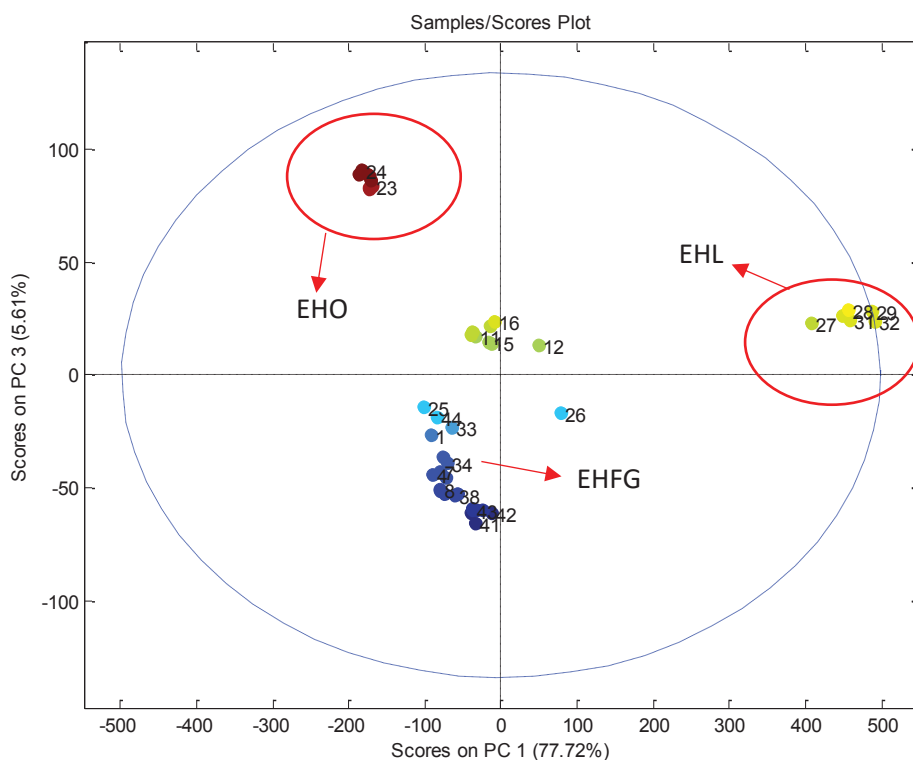
FIGURA 26 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC2 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO POSITIVA



FONTE: O autor (2018).

A diferenciação do grupo das amostras expostas a condição oxidante foi explicada pela CP3, que é mostrado na FIGURA 27, onde o grupo dessas amostras ficou localizado no quadrante positivo da CP3, distante das outras amostras. O gráfico mostra novamente a CP1, que consegue diferenciar o grupo de amostras expostas a luz. A CP3 consegue explicar 5,61% da variância acumulada das amostras.

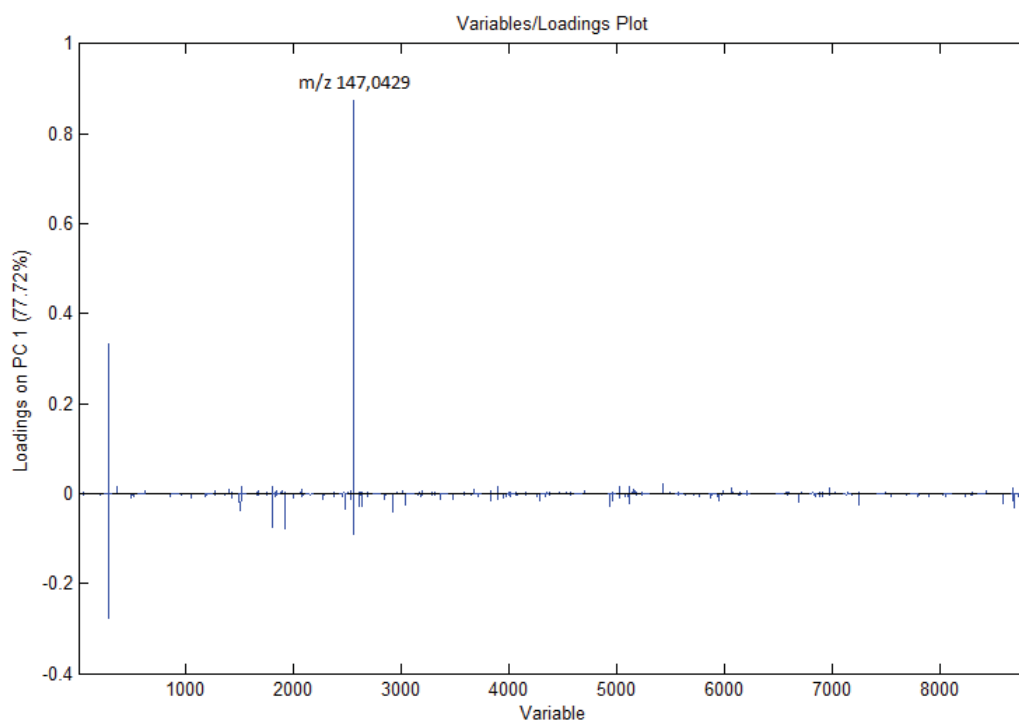
FIGURA 27 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC3 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO POSITIVA



FONTE: O autor (2018).

Após as análises dos gráficos de *scores*, procedeu-se com a construção dos gráficos de *loadings*, para a verificação de quais *m/z* estavam influenciando na diferenciação dos grupos das amostras.

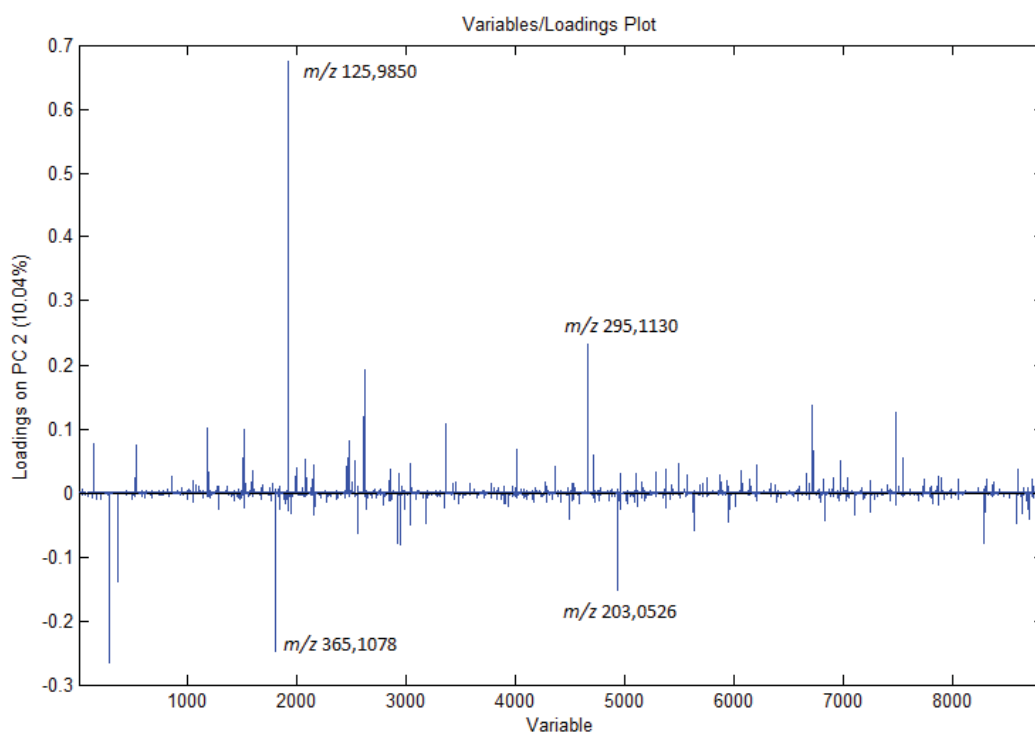
A FIGURA 28 traz o gráfico de *loadings* da CP1, onde, a partir desse gráfico pode-se verificar qual massa que mais influenciou na diferenciação dos grupos de amostras. No caso da CP1, que explicou 77,72% da variância, apenas a *m/z* 147,0429 contribuiu para a separação dos grupos que estavam no lado positivo da componente.

FIGURA 28 - GRÁFICO DE *LOADINGS* DA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (IONIZAÇÃO POSITIVA)

FONTE: O autor (2018).

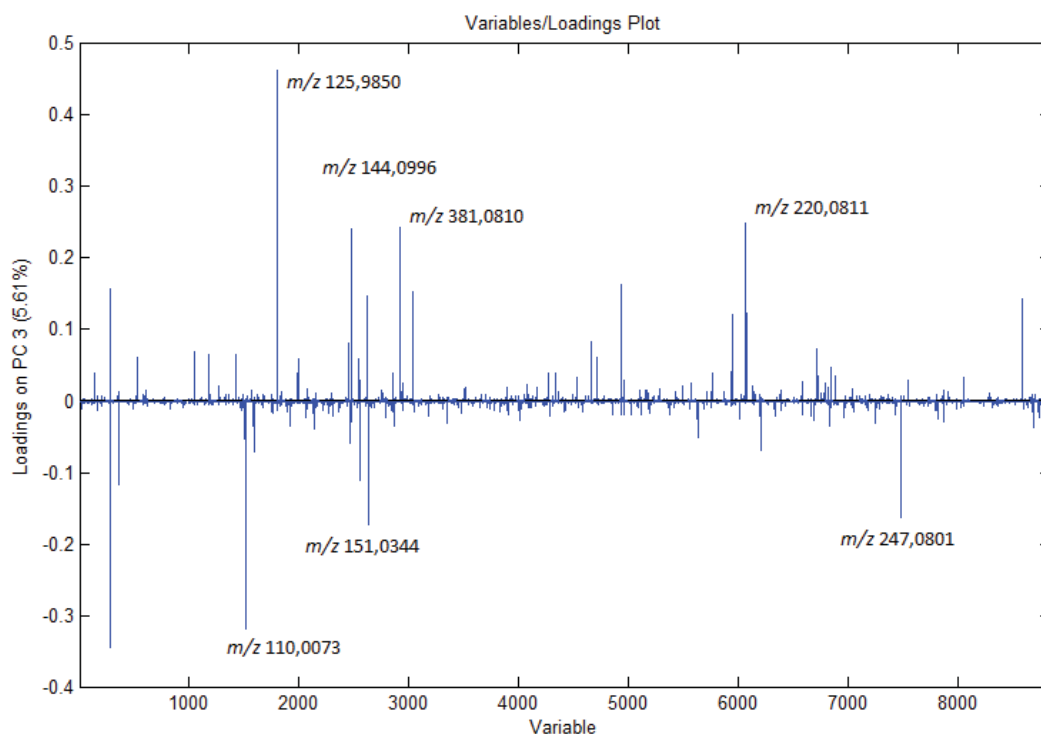
Como foi observado nas análises por CLAE-DAD, as amostras expostas a luz foram as únicas que apresentaram alterações significativas, e novamente, foi possível explicar essa alteração com o modelo quimiométrico. Observou-se que a CP1 foi explicada por completo, praticamente por apenas uma  $m/z$ , que é a cumarina. Como visto anteriormente, o ácido *o*-cumárico em presença de luz, foi convertido para cumarina, o que foi confirmado pelo modelo, onde o grupo das amostras expostas a luz está no extremo da coordenada positiva da CP1, portanto, a concentração de cumarina nas amostras EHL foi muito maior que nas demais.

Para explicar a diferenciação da componente principal 2, a FIGURA 29 traz algumas  $m/z$  que influenciaram na separação dos grupos na CP2. As  $m/z$  principais do quadrante positivo da CP2 foram  $m/z$  125,9850 e 295,1130, e para o quadrante negativo foram  $m/z$  203,0526 e 365,1078. Como já dito anteriormente, essa CP explica a separação dos grupos das amostras expostas ao calor e a base.

FIGURA 29 - GRÁFICO DE *LOADINGS* DA COMPONENTE PRINCIPAL 2 (IONIZAÇÃO POSITIVA)

FONTE: O autor (2018).

Já a FIGURA 30 explica a separação dos grupos na componente principal 3. O grupo das amostras expostas a condição oxidante foi separado das demais amostras, no quadrante positivo desta CP, como mostrado na FIGURA 27. O quadrante positivo da CP3 foi explicado, principalmente, pelas  $m/z$  125,9850, 144,0996, 381,0810 e 220,0811, e para o quadrante negativo as  $m/z$  principais foram 110,0073, 151,0344 e 247,0801.

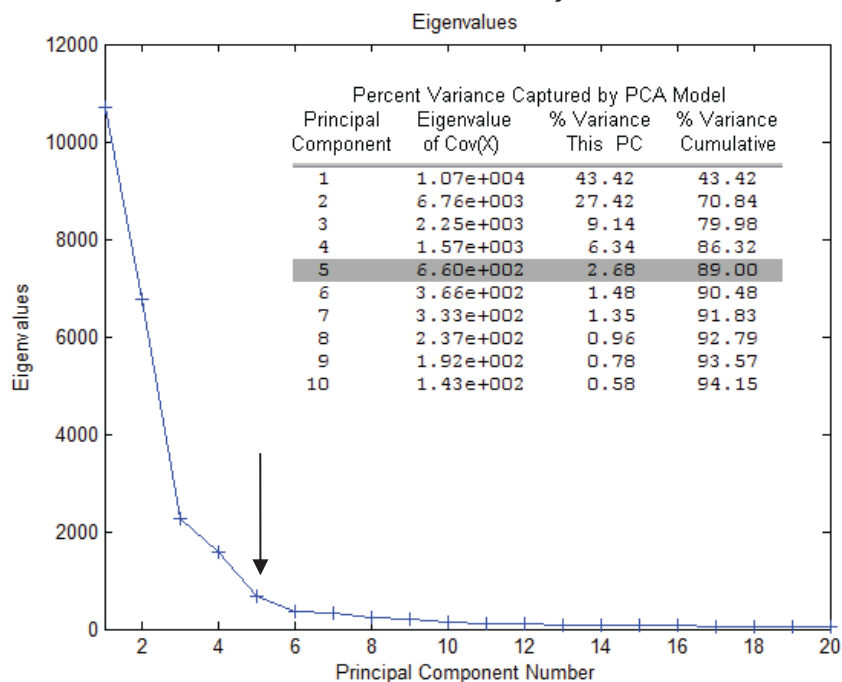
FIGURA 30 - GRÁFICO DE *LOADINGS* DA COMPONENTE PRINCIPAL 3 (IONIZAÇÃO POSITIVA)

FONTE: O autor (2018).

### 5.5.2 Análise de componentes principais das amostras do modo negativo de ionização

Para a análise de componentes principais das amostras de ionização negativa procedeu-se de modo semelhante ao das amostras em modo positivo para a escolha das CPs. Foi utilizado o gráfico de Eigenvalues versus componentes principais. Foram escolhidas cinco CPs para explicar a variância destas amostras. A partir da quinta CP, a variância acumulada explicada das seguintes CPs não foi significativa para compor o modelo. A FIGURA 31 traz o gráfico de Eigenvalues que foi utilizado para verificar a variância acumulada das componentes principais. Observou-se que com cinco componentes principais foi possível explicar 89,00% da variância acumulada.

FIGURA 31 - GRÁFICO DE EIGENVALUES X NÚMERO DE COMPONENTES PRINCIPAIS  
PARA TODAS AMOSTRAS EM IONIZAÇÃO NEGATIVA

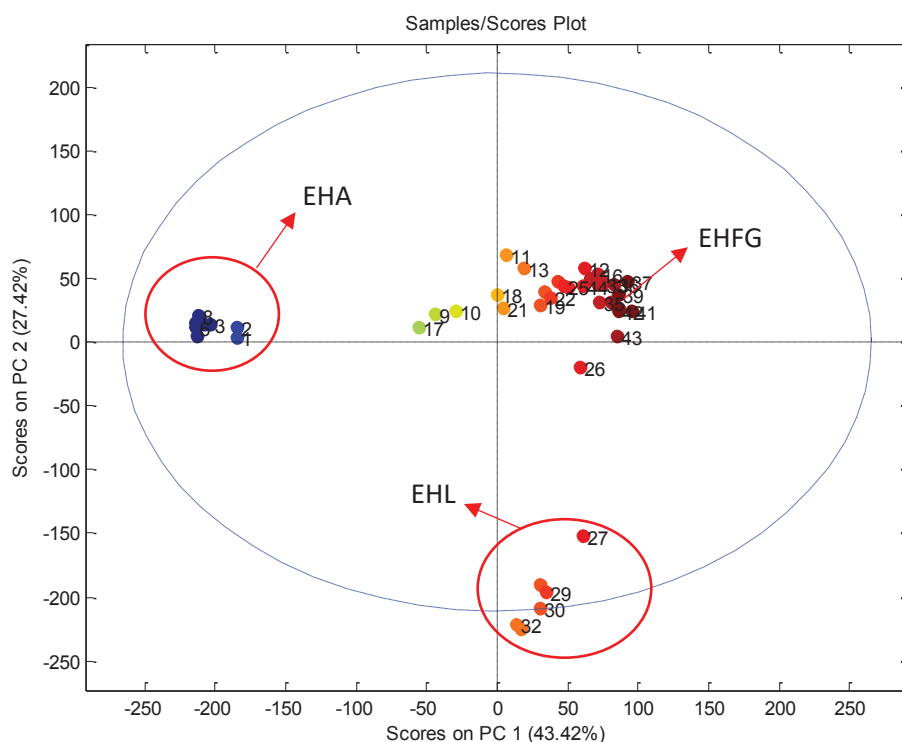


FONTE: O autor (2018)

Após a análise do gráfico de Eigenvalues, foi construído os gráficos de *scores*, onde foi analisada a distribuição dos grupos de amostras dentro das coordenadas de cada CP. A FIGURA 32 traz os *scores* da CP1 por CP2. Observa-se que a ionização negativa conseguiu fazer a separação das amostras que foram expostas ao ácido, localizando-se na coordenada negativa da CP1. O grupo das amostras expostas a luz também foi separado, como já tinha sido observado nas amostras de ionização positiva, onde o grupo ficou separado na coordenada negativa da CP2. A CP1 explica 43,42% da variância e a CP2 consegue explicar 27,42%.



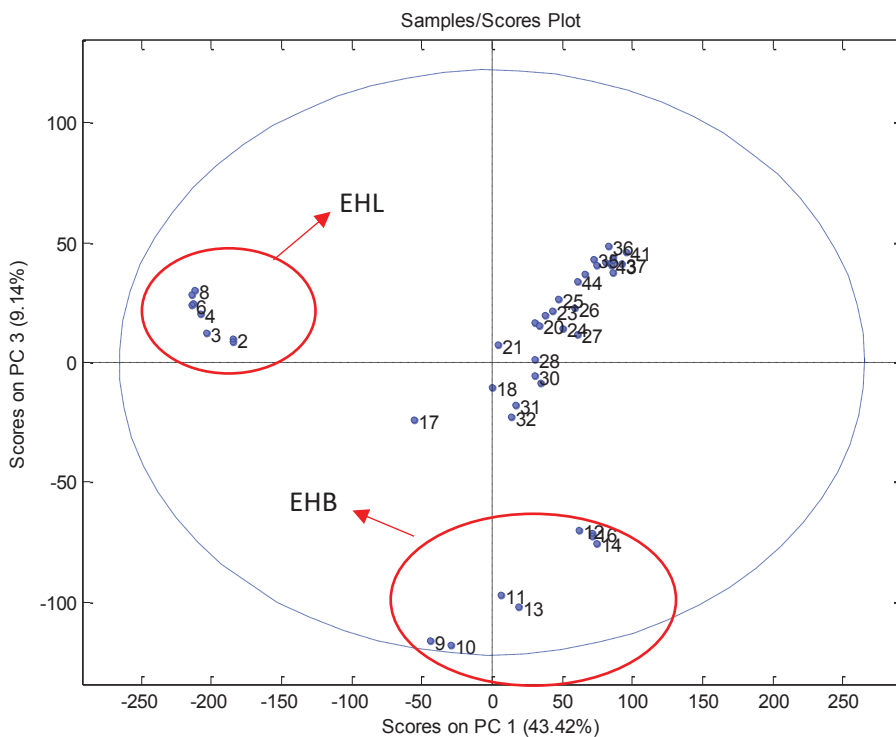
FIGURA 32 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC2 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO NEGATIVA



FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 33 traz o gráfico de *scores* da CP1 por CP3, onde a CP3 explica 9,14% da variância acumulada. A componente principal 3 conseguiu explicar a separação do grupo das amostras expostas a base das demais. Já tinha sido explicado a separação desse grupo nas amostras do modo positivo de ionização, porém com os gráficos de *loadings* observou-se outras *m/z* explicando a separação dos grupos. Isso ocorre também no grupo das amostras expostas a luz.

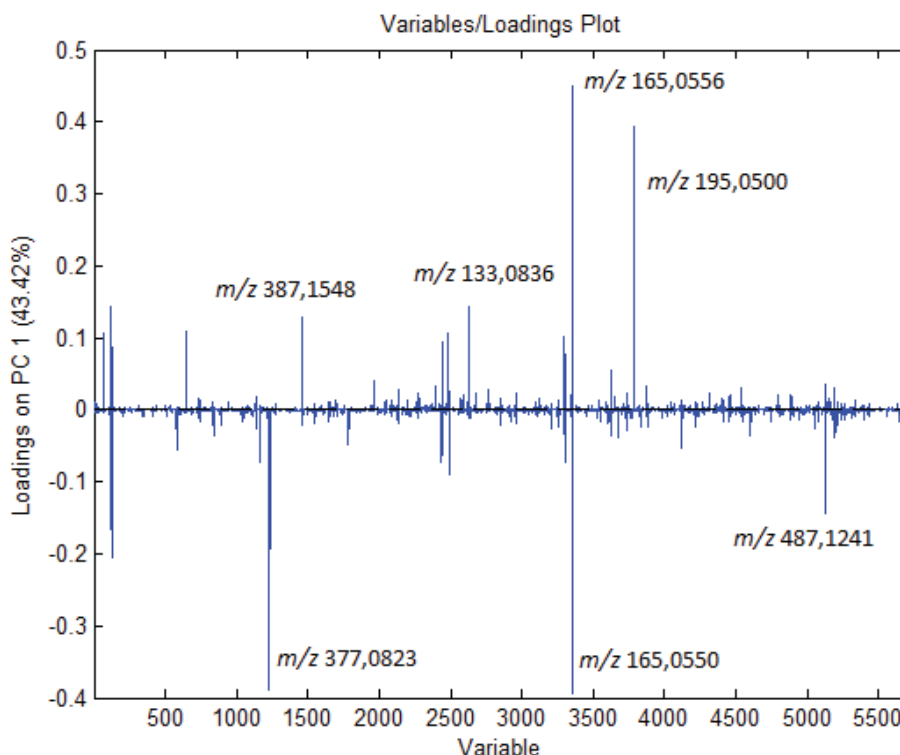
FIGURA 33 - GRÁFICO DE SCORES PC1/PC3 DAS AMOSTRAS DE IONIZAÇÃO NEGATIVA



FONTE: O autor (2018).

Após a análise dos gráficos de *scores*, foi construído os gráficos de *loadings*, onde pôde ser observado as *m/z* que influenciaram a separação dos grupos nos gráficos de *scores*. Na FIGURA 34 observa-se o gráfico de *loadings* da componente principal 1 das amostras de ionização negativa. A CP1 conseguiu explicar a separação do grupo ácido e este grupo ficou localizado na coordenada negativa da CP, portanto as *m/z* que mais influenciaram na separação foram *m/z* 165,0550, 377,0823 e 487,1241. Para os grupos que ficaram na coordenada positiva da CP1, as *m/z* que mais influenciaram foram *m/z* 133,0836, 165,0556, 195,0500 e 387,1548.

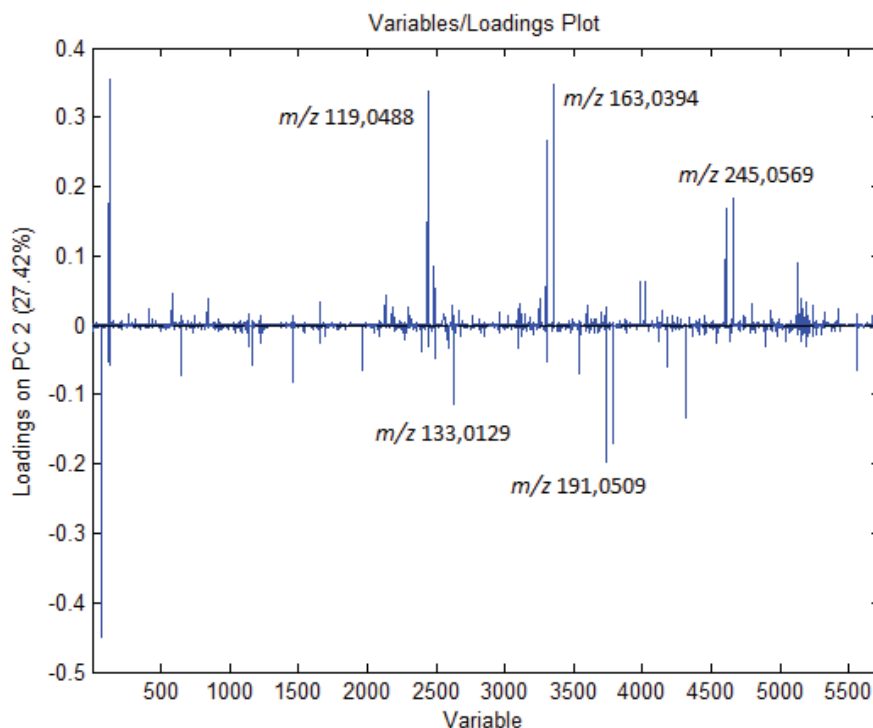
FIGURA 34 - GRÁFICO DE LOADINGS DA COMPONENTE PRINCIPAL 1 (IONIZAÇÃO NEGATIVA)



FONTE: O autor (2018).

A CP2 explicou a separação do grupo de amostras expostas a luz e a FIGURA 35 traz o gráfico de *loadings* dessa CP. O grupo da luz ficou localizado na coordenada negativa da CP e o restante das amostras localizaram-se na coordenada positiva. Os picos que mais influenciaram na separação para a coordenada positiva foram  $m/z$  119,0488, 163,0394 e 245,0569. Já para a coordenada negativa as principais  $m/z$  foram 133,0129 e 191,0509. Com essa CP pode-se explicar o que já tinha sido visto nas análises feitas por CLAE-DAD, onde o grupo exposto a luz foi o único onde observou-se alteração. Essa alteração foi a transformação do ácido *o*-cumárico em cumarina e isso foi explicado pela CP2, onde o ácido *o*-cumárico, com massa 163,0394, está presente apenas nos grupos localizados na coordenada positiva.

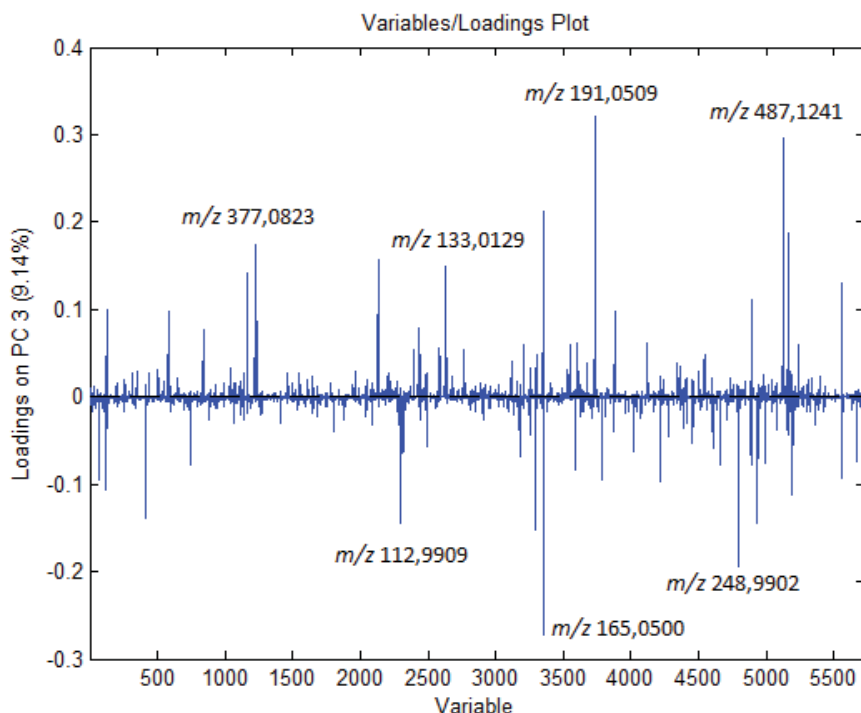
FIGURA 35 - GRÁFICO DE LOADINGS DA COMPONENTE PRINCIPAL 2 (IONIZAÇÃO NEGATIVA)



FONTE: O autor (2018).

Por fim, a FIGURA 36 traz o gráfico de *loadings* da componente principal 3, que explica a separação do grupo das amostras expostas a base. Este grupo ficou localizado na coordenada negativa da CP e as principais  $m/z$  que influenciaram na separação foram  $m/z$  112,9909, 165,0500 e 248,9902. Para a coordenada positiva as principais foram  $m/z$  133,0129, 191,0509, 377,0823 e 487,1241.

FIGURA 36 - GRÁFICO DE LOADINGS DA COMPONENTE PRINCIPAL 3 (IONIZAÇÃO NEGATIVA)



FONTE: O autor (2018).

Concluindo o modelo de análises de componentes principais (PCA), observou-se que as amostras do modo negativo de ionização complementaram a explicação da separação dos grupos das amostras do modo positivo. No modo positivo, nenhuma das componentes principais conseguiu explicar uma separação nas amostras ácidas e no modo negativo houve essa explicação.

O extrato de guaco possui uma quantidade imensa de substâncias, como foi observado nas análises por espectrometria de massas, e o tempo necessário para caracterizar todas as massas que estão influenciando na separação dos grupos seria muito grande, sendo assim, este trabalho considerou apenas compostos de massas já conhecidas.

A aplicação da quimiometria, juntamente com métodos analíticos clássicos contribui para que, além de confirmações de resultados, possa ser utilizado para analisar dados que um método analítico sozinho não conseguiria fazer. O modelo criado e aplicado neste trabalho foi considerado capaz de diferenciar e separar todos os grupos de amostras (estáveis e não estáveis) e pode ser utilizado como um forte aliado aos métodos analíticos na predição do prazo de validade de amostras de extratos vegetais.

## 6 CONCLUSÃO

O controle de qualidade de fitoterápicos é de grande importância dentro da indústria farmacêutica, e monitorar a estabilidade de drogas vegetais é um grande desafio, pela complexidade de substâncias presentes em sua composição. O guaco é um medicamento amplamente utilizado no tratamento e profilaxia de doenças do trato respiratório e não há um modelo de estudos de estabilidade que avalie o fitocomplexo como um todo. O presente trabalho mostrou que é possível, com o auxílio de ferramentas analíticas e estatística, monitorar a estabilidade de extratos em diferentes condições de estresse. Com a utilização das técnicas analíticas aplicadas (CLAE-DAD e CLUE-Q-TOF) e aliando uma delas à quimiometria, permitiu verificar mudanças na composição química do extrato, prevendo possíveis degradações.

A técnica por CLAE-DAD mostrou-se eficiente e conseguiu detectar a diferença no grupo de amostras expostas à luz em diferentes tempos, onde constatou-se a diminuição do teor de ácido *o*-cumárico, relacionado ao aumento no teor de cumarina. Porém, essa técnica teve a limitação de conseguir quantificar apenas dois compostos (cumarina e ácido *o*-cumárico), e diferenciando apenas o grupo de amostras expostas à luz onde ocorreu a variação do teor destes dois compostos dentro do tempo em que foi avaliada.

Com a introdução da técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas com detector tipo Q-TOF, foi possível avaliar as possíveis alterações na composição química do extrato de guaco de uma maneira mais rápida e mais eficiente que o CLAE-DAD. O espectrômetro de massas fornece uma quantidade imensa de dados, cuja análise pode ser considerada inviável sem nenhum tipo de tratamento estatístico. Daí a importância de se aliar a quimiometria ao método analítico utilizado.

A análise quimiométrica utilizada para o tratamento dos dados fornecidos pelo espectrômetro de massas foi a PCA (*Principal Component Analysis*). A técnica foi considerada capaz de diferenciar todos os grupos de amostras do extrato de guaco, submetidos a diferentes condições de estresse, permitindo a separação das amostras com diferentes tempos de exposição ao estresse. Foi possível identificar diversas relações massa/carga que tiveram influência na separação dos grupos de amostras.

A técnica CLUE-Q-TOF aliado à quimiometria, se mostrou eficiente para avaliar a estabilidade de extratos a base de guaco e também deixa claro que a quantificação de um único marcador (cumarina) para a avaliação da estabilidade destes extratos pode não ser o modo mais adequado de se avaliar a estabilidade de uma mistura complexa de metabolitos. Isto torna-se relevante quando o extrato é considerado um fitocomplexo, onde diversas substâncias podem estar atuando em conjunto para a atividade farmacológica.

## REFERÊNCIAS

AHUJA, S. S. Assuring quality of drugs by monitoring impurities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 3-11, 2007.

ALVES, C. F. et al. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1097-1104, 2009.

ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2003.

BARBOSA, L. C. et al. *Mikania glomerata* Sprengel (Asteraceae) influences the mutagenicity induced by doxorubicin without altering liver lipid peroxidation or antioxidant levels. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 75, n. 16-17, p. 1102-9, 2012.

BERTOLUCCI, S. K. et al. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica**, v. 75, n. 3, p. 280-285, 2009.

BERTOLUCCI, S. K. et al. Isolation and HPLC quantitation of kaurane-type diterpenes and cinnamic acid derivatives of long-term stored leaves of *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 2, p. 473-485, 2013a.

BERTOLUCCI, S. K. et al. Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *M. glomerata* leaves under different shade levels. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 2, p. 288-95, 2013b.

BIAVATTI, M. W. et al. Coumarin content and physicochemical profile of *Mikania laevigata* extracts. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 3-4, p. 197-200, 2004.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. D.; DUARTE, M. G. R. Comparative study of the chemical composition of the species *Mikania glomerata* Sprengel and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 294-298, 2009.

BOTT, R. F. **Influência do processo de obtenção, das condições de armazenamento e das propriedades físico-químicas sobre a estabilidade de extratos secos padronizados de plantas medicinais**. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.



BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 1929.

BRASIL. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 104, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56-59.

BRASIL. Anvisa. Resolução RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Determina o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade – Revoga o disposto na Resolução RE nº 398 de 12 de novembro de 2004. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 146, 01 ago. 2005a. Seção 1, p. 119.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS**, março de 2009a. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3487-ms-elabora-relacao-de-plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus> >. Acesso em: 3 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM nº 2982 de 26 de novembro de 2009. Aprova as normas de execução e de financiamento da Assistência Farmacêutica na Atenção Básica. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 228, 30 nov. 2009b. Seção 1, p. 771-773.

BRASIL. Anvisa. Instrução Normativa nº 02 de 13 de maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado” – Revoga o disposto na Instrução Normativa nº 5 de 11 de dezembro de 2008. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 90, 14 mai. 2014a. Seção 1, p. 58-61.

BRASIL. Anvisa. Instrução Normativa nº 04 de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 116, 20 jun. 2014b. Seção 1, p. 86.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de fitoterápicos. Ministério da Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 90, 14 mai. 2014c. Seção 1, p. 52-58.

BRASIL. Anvisa. Resolução RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de

degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 233, 7 dez. 2015. Seção 1, p. 48-49.

BUENO, P. C. P. **Desenvolvimento e validação de metodologia analítica em cromatografia gasosa para o controle de qualidade de *Eucalyptus globulus* e seus produtos: planta desidratada, extratos, óleo essencial e xarope de eucalipto**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CAPPELARO, E. A.; YARIWAKE, J. H. HS-SPME-GC-MS Analysis of Volatile and Semi-Volatile Compounds from Dried Leaves of *Mikania glomerata* Sprengel. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 427-430, 2015.

CARVALHO, V. A. P. **Caracterização Química por Cromatografia Líquida e Análise Quimiométrica de espécies vegetais de *Bauhinia* com aplicação em controle de qualidade de amostras comerciais de “pata-de-vaca”**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2011.

CAVALLAZZI, M. L. **Plantas medicinais na atenção primária à saúde**. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 6, p. 706-709, 2001.

CHERNUSHEVICH, I. V.; LOBODA, A. V.; THOMSON, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 8, p. 849-865, 2001.

COLLAÇO, R. D. C. O. et al. Protection by *Mikania laevigata* (guaco) extract against the toxicity of *Philodryas olfersii* snake venom. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 614-622, 2012.

COSTA, R. D. J. et al. In vitro study of mutagenic potential of *Bidens pilosa* Linné and *Mikania glomerata* Sprengel using the comet and micronucleus assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 1, p. 86-93, 2008.

CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DOW, L. K. et al. The assessment of impurities for genotoxic potential and subsequent control in drug substance and drug product. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1404-18, 2013.

ERIKSSON, L.; ANDERSSON, P. L.; JOHANSSON, E.; TYSKLIND, M. Megavariate analysis of environmental QSAR data. Part I—A basic framework founded on principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS), and statistical molecular design (SMD). **Molecular Diversity**, v. 10, p. 169-186, 2006.

FERREIRA, F. P.; OLIVEIRA, D. C. R. D. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 6856-6859, 2010.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724 -731, 1999.

FERREIRA, T. S. et al. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

FRANCISCO, T. M. G. **A espectrometria de massas por infusão direta**. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

GASPARETTO, J. C. **Determinação de metabólitos secundários do guaco nas especialidades farmacêuticas xarope e solução oral via CLAE-DAD e CLAE-EM/EM**. 236 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GASPARETTO, J. C. et al. Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 7, p. 740-748, 2011.

GASPARETTO, J. C. et al. *Mikania glomerata* and *M. laevigata*: Clinical and Toxicological Advances. In: ACREE, B. (Ed.). **Toxicity and Drug Testing**. Rijeka: InTech, 2012. p.297-320.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 140-150, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOWDA, G. A. N.; ZHANG, S. C.; GU, H. W.; ASIAGO, V.; SHANAIAH, N.; RAFTERY, D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p.617-633, 2008

GRACA, C. et al. In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 3, p. 430-439, 2007.

HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3ª ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2007.

JANZEN, H. **Forced degradation studies - comparison between ICH, EMA, FDA and WHO guidelines and ANVISA's resolution RDC 53/2015**. 57 f. Dissertação (Mestrado em Assuntos Regulatórios de Medicamentos) - Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Universidade Rheinische Friedrich-Wilhelm-Bonn, Alemanha, 2016.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MELO, L. V. D.; SAWAYA, A. C. H. F. UHPLC-MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 105-110, 2015.

MOURA, R. S. D. et al. Bronchodilator activity of *Mikania glomerata* Sprengel on human bronchi and guinea-pig trachea. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 2, p. 249-256, 2002.

MUCENEEKI, R. S. et al. A Simple and Validated LC Method for the Simultaneous Determination of Three Compounds in *Mikania laevigata* Extracts. **Chromatographia**, v. 69, p. 219-223, 2009.

MUNSON, C. A.; LUCIA, F. C.; PIEHLER, T.; MCNESBY, K. L.; MIZIOLEK, A. W. Investigation of statistics strategies for improving the discriminating power of laser-induced breakdown spectroscopy for chemical and biological warfare agents simulants. **Spectrochimica Acta part B**, v. 60, p. 1217-1224, 2005.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 7, p. 809-20, 2010.

NAUSHAD, M.; KHAN, M. R. **Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry: Evaluation and Application in Food Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

NOGUEIRA, N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N. D. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e miniaturizada. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 2, p. 44-50, 2011.

PASSARI, L. M.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Analytica Chimica Acta**, v. 821, p. 89-96, 2014.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RUFATTO, L. C. et al. *Mikania laevigata*: chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 883-889, 2013.

SANTANA, L. C. et al. *Mikania glomerata*: Phytochemical, Pharmacological, and Neurochemical Study. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 710410, 2014.

SANTOS, S. C. D. et al. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 679-684, 2006.

SILVA, L. S. et al. Preparation of Dry Extract of *Mikania glomerata* Sprengel (Guaco) and Determination of Its Coumarin Levels by Spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, v. 17, p. 10344-10354, 2012.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. 9<sup>a</sup> ed. Belmont: Brooks/Cole, 2014.

ZHANG, M. et al. Fingerprint Analysis of *Desmodium Triquetrum* L. Based on Ultra Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detector Combined with

Chemometrics Methods. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 706-712, 2016.

ZHU, H. et al. Fingerprint analysis of *Radix Aconiti* using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization/ tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MS n) combined with stoichiometry. **Talanta**, v. 103, p. 56-65, 2013.

## ANEXOS

QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(continua)

Referências	Espécie utilizada	Amostra	Metodologia	Metabólitos
(CAPPELARO; YARIWAKE, 2015)	<i>Mikania glomerata</i>	Folhas secas – Micro extração em fase sólida com Headspace. Injeção em CG-EM	CG-EM: - Coluna: HP-5 MS (25 m x 0,25 mm x 0,3 mm) - Injeção <i>splitless</i> por 5 min e posteriormente <i>split</i> (1:10). - Temperatura injetor: 230 °C - Temperatura forno: 40 °C (5 min) a 125 °C (4 °C/min), depois a 140 °C (1,5 °C/min) durante 4 min e finalmente a 250°C durante 5 min (5 °C/min). - Fluxo 1,0 mL/min	$\alpha$ -tujeno, $\alpha$ -pineno, tuja-2,4(10)-dieno, sabineno, $\beta$ -pineno, $\beta$ -mirceno, p-cimeno, limoneno, acetofenona, perileno, $\alpha$ -canfolenal, trans-pinocarveol, tras-verbenol, pinocarvona, p-cimen-8-ol, butirato de cis-3-hexenil, mirtenal, mirtenol, carvomentona, verbenona, tras-carveol, $\delta$ -elemeno, $\alpha$ -cubebeno, $\alpha$ - ilangeno, $\alpha$ -copaeno, 3,4-dihidrocumarina, $\beta$ - burboneno, $\beta$ -cubeneno, $\beta$ -elemeno, $\beta$ -cariofileno, humuleno, allo-aromadendreno, germacreno-D, bicyclgermacreno, $\alpha$ -muroleno, $\gamma$ -cadineno, $\delta$ -cadineno, $\alpha$ -calacoreno, espatulenol, óxido de cariofileno, 1,5-epóxi salvial-4(14)-eno, salvial-4(14)-e- 1-ona, epóxido de humuleno II, nor-copanona, cariofile-4(14),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol, cariofile-3,8(13)-dien-5 $\beta$ -ol, $\gamma$ -1-cadinol, 14-óxi- $\alpha$ -muroleno, 10-oxo-isodauc- 3-en-15-ol, beiereno, kaureno, atisereno, acetona hexahidrofarnsil, óxido de epi-13-manoil, beieren-18-al, beieren-18-ol, kauren-16-ol, beieren-9- ol.
(MELO; SAWAYA, 2015)	<i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	Folhas secas extraídas com etanol 67%, na proporção de 200 g de folhas para 1,0 L de solvente.	CLAE-EM: - Coluna: C18 BEH Acquity Waters (50 x 2.1mm; 1.7 $\mu$ m) - Temperatura: 30 °C - Fluxo: 200 $\mu$ m/min - Fase móvel: Água com 0.1% de ácido fórmico e acetonitrila.	Cumarina e ácido clorogênico



QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(continuação)

(PASSARI; SCARMINIO; BRUNS, 2014)	<i>Mikania laevigata</i>	Diversas extrações com misturas de solventes em proporções variadas (acetona, clorofórmio, diclorometano e etanol). Ultrassom por 30 min. 10 mg de cada fração dissolvidas em 200 µL metanol. 20 µL da solução diluída em 980 µL da fase móvel.	<div>           CLAE-DAD:            - Coluna: Phenomenex Gemini C18            ODS PN038 (250 x 4.6mm; 5µm)            - Temperatura: 23 °C            - Injeção: 20µL            - Fluxo: 1 mL/min (isocrática)            - Comprimento de onda: 274 nm         </div> <div>           CLUE-ESI-EM:            - Coluna: Waters Acquity (50mm x            2.1mm; 1.7µm)            - Quattro Micro triplo-quadrupolo MS,            equipado com ESI         </div>	Cumarina, ácido o-cumárico, ácido meliolítico
(SANTANA et al., 2014)	<i>Mikania glomerata</i>	Percolação com solução hidroalcoólica 70%. Concentrado em rotaevaporador e liofilizado.	<div>           CLAE-DAD:            - Coluna: Dionex Acclaim RP-18 (100            x 2,1 mm; 5µm)            - Temperatura: 30 °C            - Comprimento de onda: 330 nm            - FM: Metanol:Água (+ 0,1% ácido            acético).            - Fluxo: 0.8 mL/min         </div>	Metilcinamato, 2H-1-benzopirran-2-ona, (2- hidróxifenil)metilpropionato (Z)-metil-hexadec-7-anoato, hexadecanoato de metila, ácido hexadecanóico, (Z)-metil-octadec-9-anoate, ácido octa3decanoico e esqualeno.
(BERTOLUCCI et al., 2013a)	<i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	Percolação exaustiva em etanol 96%, à temperatura ambiente.	<div>           CLAE-DAD:            - Coluna: Lichrospher 100 RP-18 (125            x 4 mm; 5µm) – Merck.             RMN <sup>1</sup>H         </div>	Cumarina, ácido benzoilgrandiflorico, ácido caurenóico, ácido cinamoilgrandiflorico.



QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(continuação)

(BERTOLUCCI et al., 2013b)	<i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	Extração com etanol (2 x 30 mL) em ultrassom.	CLAE-DAD: - Coluna: Lichrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm; 5µm) -Merck - Fase móvel: metanol e acetonitrila - Fluxo: 1,0 mL/min - Temperatura: 25 °C - Comprimentos de onda: 210 nm, 230 nm, 270 nm.	Cumarina, ácido o-cumárico, ácido benzoilgrandiflorico, ácido cinamoilgrandiflorico e ácido caurenóico
(RUFATTO et al., 2013)	<i>Mikania laevigata</i>	Maceração em ultrassom, à temperatura ambiente, por 20 min, utilizando: Hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e etanol/água (1:1, v/v). Dissolvido em etanol 50%.	CG/EM: - Coluna – HP-5MS 5% fenilmetilsiloxano (30 m X 250 µm x 0,25 µm) - Temperatura: 40 °C (4 min), 310 °C (35 min) - Injeção: 1 µL	4-amino-1-pentanol, β-pineno, cumarina, dihidrocumarina, escopoletina, curcumenol, ácido o-cumárico, psoralen, ácido caurenóico, o-geranilescooletina, ácido cinamoilgrandiflorico.
(BARBOSA et al., 2012)	<i>Mikania glomerata</i>	Maceração hidroalcoólica, por 20 dias	CG: - Coluna: HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) - Temperatura forno: 100 °C a 250 °C (15 °C/min) - Fluxo hidrogênio e nitrogênio: 1,8 mL/min - Injeção Split (1:20): 1 µL	Cumarina
			CG-EM: - Coluna: DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) - Fluxo hélio: 1,0 mL/min - Temperatura forno: 100 °C a 280 °C (5 °C/min)	

QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(continuação)

				Espectrofotometria UV:	Cumarina
				- Padrão: 2H-1-benzopyran-2-one - Solvente: Metanol/Água 80:20  CLAE-UV/DAD - Coluna: LC-18 (250 x 4 x 5 mm) zorbax sb-18 - Temperatura: 25 °C - Fluxo: 1 mL/min (Isocrático) - Fase móvel: Acetonitrila:Água 40:60 - Comprimento de onda: 274 nm	
(SILVA et al., 2012)	<i>Mikania glomerata</i>	Extrato seco por liofilização.		CLAE-EM/EM: - ESI+ FM: Água e acetonitrila + 0,05% ácido fórmico.  - ESI- FM: Água e Água/acetonitrila 97:3 + 5mM formiato de amônio (ambos). - Coluna: XBridge C18 150 x 2,1 mm (5µm)	
(GASPARETTO et al., 2011)	<i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	Tintura de guaco hidroalcoólica – diluída 1:10000 (v/v). Extrato aquoso concentrado – diluída 1:100000 (v/v). Xarope de guaco e soluções orais – diluídas 1:1 (v/v).		ESI (-) Ácido o-cumárico, ácido caurenóico, siringaldeído e predinisona (Padrão Interno)  ESI (+) Cumarina, dihidrocumarina e 6-metilcumarina (Padrão Interno)	

QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(continuação)

(FERREIRA; OLIVEIRA, 2010)	<i>Mikania laevigata</i>	Percolação em etanol 95%	<p>CG-EM:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)</li> <li>- Fluxo: 2,0 mL/min</li> <li>- Injeção: 1 µL</li> <li>- 75 °C (6 min), 170 °C (5 min), 260 °C (1 min), 280 °C (15 min), 300 °C (3 min).</li> </ul> <p>RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C</p> <p>Sephadex LH-20</p>	<p>CG-EM:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Taraxerol, lupeol, cumarina, ácido beierenólico, ácido caurenólico, óxido de cariofileno, espatulenol, dihidrocumarina e acetato de lupeol</li> </ul> <p>Sephadex LH-20:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ácido orto-[(5'-hidróxi)-cis-cinamoil]-trans-cinâmico, ácido 19-norcaur-16-ene-18-óico</li> </ul>
(ALVES et al., 2009)	<i>Mikania laevigata</i>	Maceração com etanol 70%, com agitação, por 21 dias (proporção planta:solvente 1:8 p/v)	<p>CG-EM:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna HP-5 MS (25 m x 0,25 mm x 1,0 µm)</li> <li>- Temperatura forno: 110 °C (2 min), 300 °C (10 min)</li> <li>- Temperatura injetor: 250 °C</li> <li>- Temperatura detector: 280 °C</li> <li>- Injeção Split</li> </ul>	Dihidrocumarina, cumarina, espatulenol, ácido caurenólico e ácido ent-beier-15-en-19-óico.
(BOLINA; GARCIA; DUARTE, 2009)	<i>Mikania glomerata e Mikania laevigata</i>	Percolação exaustiva em etanol. Evaporado a 60 °C.	<p>Cromatografia em camada delgada (CCD)</p> <p>CLAE-UV</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fluxo: 0,5 mL/min (isocrático)</li> <li>- FM: Água/metanol 53:47</li> <li>- Comprimento de onda: 210nm</li> <li>- Coluna: ODS Hypersil (125 x 4 nm, 5µm)</li> </ul>	Cumarina, triterpenos, esteroides e heterosídeos flavônicos

QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(continuação)

(MUCENEEKI et al., 2009)	<i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	Extrato Hidroalcoólico, obtido através de percolação em etanol- água 1:2 (v/v) e concentrado para 1:2 (p/v). Injeção: diluição 1:100 em fase móvel.	CLAE-DAD Injeção: 20µL Coluna: Phenomenex Synergi 4µ Fusion RP 80A (250 x 4.6 mm)	Siringaldeído, cumarina, ácido o-cumárico
(BERTOLUCCI et al., 2009)	<i>Mikania laevigata</i>	Extração com acetato de etila, diclorometano, diclorometano seguido de etanol, etanol, diclorometano:etanol 1:1 (diferentes vezes)	CLAE-DAD - Coluna: LiChrospher 100 RP-18 (125x4 mm, 5µm; Merck)	- Diterpenos: Ácido benzoilgrandiflórico, ácido cinamoilgrandiflórico  - Derivados do ácido cinâmico: Cumarina e ácido o-cumárico
(COSTA et al., 2008)	<i>Mikania glomerata</i>	Infusão das folhas e extrato alcoólico (maceração em etanol 80%)	CLAE-UV - Coluna: Shim-pack ODC-18 (4,6 mm x 250 mm x 5µm) - FM: Acetonitrila e água - Fluxo 0,7 mL/min - Comprimento de onda: 274 nm	Cumarina
(GRACA et al., 2007)	<i>Mikania laevigata</i>	Maceração etanol 33 GL/água (7:3 v/v)	CG-EM - Coluna: DB-225 MS (30 m x 0,25 mm) - Gás: Hélio - 50 °C (1 min) – 220°C (40 °C/min) por 19 min	Cumarina

QUADRO 3 - METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA GUACO

(conclusão)

(SANTOS et al., 2006)	<i>Mikania glomerata</i> e <i>Mikania laevigata</i>	<p>-Extração Hidroalcoólica: Percolação etanol/água 1:2 (v/v)</p> <p>-Extração aquosa: Infusão 1% p/v de folha seca</p>	<p>CLAE-DAD:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: Waters Nova-Pak RPC18 (150 x 3,9; 4µm).</li> <li>- FM: Acetonitrila:0,01% ácido acético aquoso 20:80 (v/v).</li> <li>- Fluxo: 1,2 mL/min</li> <li>- Comprimento de onda: 275 nm</li> <li>- Temperatura: 30 °C</li> </ul>	Ácido o-cumárico, cumarina
(BIAVATTI et al., 2004)	<i>Mikania laevigata</i>	Percolação (etanol 36, 60 e 70% v/v) e maceração por 7 dias a 50 °C	<p>CLAE-DAD</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: Phenomenex Luna RPC18 (5µm), 4,6mm x -250mm.</li> <li>- Comprimento de onda: 274 nm</li> <li>- Temperatura: 30 °C</li> </ul>	Cumarina
(MOURA et al., 2002)	<i>Mikania glomerata</i>	<p>Maceração com etanol, por 15 dias. O macerado foi submetido novamente a maceração por mais dois dias.</p>	<p>CG-DIC</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: capilar (25 m x 0,3 mm x 0,25 µm)</li> <li>- Injeção: 1 µL (Split 1:25)</li> <li>- Fluxo: 65 cm/s</li> <li>- Temperatura forno: 140 – 280 °C</li> <li>- Temperatura injetor: 250 °C</li> <li>- Temperatura detector: 280 °C</li> <li>- Gás: Hélio</li> </ul>	Cumarina
		<p>Fração diclorometano – CG-DIC</p> <p>Fração aquosa – CG-MS</p>	<p>CG-EM</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ionização por impacto de elétrons</li> <li>- Coluna: capilar (25 m x 0,22 mm x 0,5 µm)</li> <li>- Temperatura forno: 140 – 280 °C</li> <li>- Temperatura injetor: 280 °C</li> <li>- Gás: Hidrogênio</li> </ul>	Ácido o-cumárico, dihidrocumarina, cumarina, 1-etoxi-1-feniletanol, 4-hidróxi-3,5-dimetoxibenzaldeído, ácido hexanóico, etil hexanodecanoato, fitol, hidrocarbonetos insaturados, etil linoleato, caurenol, ácido caurenóico (isômero) e ácido car-16-en-18-oico

FONTE: O Autor, 2018